



Universidade do Algarve

Instituto Superior de Engenharia

***Análise Físico-química de azeites produzidos
em lagares da região do Algarve – Portugal***

Donivaldo Antonio Lopes de Oliveira

Relatório de trabalho final

Mestrado em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof^a Doutora. Ana Cristina O. L. Figueira

Faro

2014



Universidade do Algarve
Instituto Superior de Engenharia

***Análise Físico-química de azeites produzidos
em lagares da região do Algarve – Portugal***

Donivaldo Antonio Lopes de Oliveira

Relatório de trabalho final de Mestrado em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof^a. Doutora Ana Cristina O. L. Figueira

Faro

2014



Universidade do Algarve

Instituto Superior de Engenharia

***Análise Físico-química de azeites produzidos em lagares
da região do Algarve – Portugal***

Declaração de autoria de trabalho

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluídas.”

Donivaldo Antonio Lopes de Oliveira

Copyright Donivaldo Antonio Lopes de Oliveira

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

‘Não acredite em algo simplesmente porque ouviu. Não acredite em algo simplesmente porque todos falam a respeito. Não acredite em algo simplesmente porque está escrito em seus livros religiosos. Não acredite em algo só porque seus professores e mestres dizem que é verdade. Não acredite em tradições só porque foram passadas de geração em geração. Mas depois de muita análise e observação, se você vê que algo concorda com a razão, e que conduz ao bem e benefício de todos, aceite-o e viva-o’

Buda.

Dedicatória e Agradecimentos

Gostaria de poder escrever o nome de todas pessoas especiais para mim neste momento, mas isso não seria possível fisicamente, por isso citarei alguns e os demais que se sintam agradecidos.

Dedico este trabalho aos meus pais Donivaldo e Lúcia. Aos Meus irmãos Patricia, Cristiane, Viviane, Veronica, Rafael, Rafaela e Vinicius; a todos os meus sobrinhos que amo muito. Ao Alberto Calderoni e à duas amigas muito especiais que sempre me motivaram e me incentivaram a ir em busca dos meus sonhos Cássia e Lucimara.

De forma especial meus agradecimentos são para a Professora Ana Cristina pela oportunidade de trabalho, a técnica de laboratório que se tornou uma grande amiga Vera Gonçalves, a Teresa Cavaco pela ajuda no laboratório, a funcionária Luisa Silva, à minha amiga, companheira e madrinha Ana Carolina Vieira.

De forma geral lembro neste momento de todos os meus amigos que sempre me deram uma palavra de incentivo e me confortaram durante esses anos em que morei fora do Brasil. Ao amigos que conheci em Portugal, em especial a Maria Jose Brazuna que me ajudou sempre quando eu precisava, este trabalho em parte se deve a ajuda desta grande amiga.

Resumo

O azeite é um óleo vegetal característico líquido a temperatura de 20 °C extraído por meios mecânicos (e por vezes químicos) do fruto da Oliveira (*Olea europaea L.*) (Harwood & Aparicio, 2000). Faz parte e é a principal fonte de lipídios da saudável Dieta Mediterrânica, é rico em ácidos gordos mono-insaturados e anti-oxidantes naturais. As propriedades organoléticas e sensoriais deste produto são mantidas no azeite virgem pois este não precisa do processo de refinação para ser consumível (Aguilera, 2005).

Podemos encontrar na composição do azeite uma quantidade considerável de clorofilas, carotenóides e tocoferol (vitamina E), antioxidantes naturais que contribuem para melhorar a qualidade de vida dos consumidores. Em termos de qualidade, o azeite possui características únicas e o produto final deve estar dentro dos padrões estabelecidos por lei. Os factores sensoriais possuem uma grande importância neste requisito, ainda se toma por base o valor nutricional, as propriedades organoléticas, a origem do produto (no caso de DOP), ausência de contaminantes tóxicos e as práticas agronómicas adotadas para o cultivo da oliveira (Ninfali et al., 2007).

Devido a variações na composição, o controlo da qualidade pode fornecer importantes indicações sobre a idade de um óleo ou azeite. Esta característica está relacionada com a variação dos componentes do azeite, que divergem muito com a variedade da azeitona, as condições climáticas, o tipo de solo, a época de colheita e ainda a região produtora e suas tipicidades.

O objetivo deste trabalho foi explorar as qualidades físico-químicas de azeites produzidos em lagares da região do Algarve. Para este fim 19 amostras referentes às safras 2009, 2010 e 2011 foram coletadas e congeladas e posteriormente analisadas.

Os resultados obtidos para a acidez e índice de peróxidos nos permitiu classificá-los como azeites virgens, sendo que a análise de compostos fenólicos produziu resultados bem expressivos e em média de acordo com os resultados encontrados na literatura. Outro factor importante foi constatar uma boa correlação entre os compostos de cor (método CIELAB) tendo boas correlações entre a componente b^* com a concentração de carotenóides totais e a componente a^* com a concentração de clorofilas.

As concentrações de compostos fenólicos totais nas amostras analisadas estão de acordo com as médias encontradas na literatura.

Palavras-chave: Azeite virgem, polifenóis, clorofilas, carotenóides, Dieta Mediterrânica, Algarve.

Abstract

Olive oil is a characteristic natural fat liquid at 20 °C produced by mechanical (or even chemical) methods from the Olive tree (*Olea europaea L.*) fruits (Harwood & Aparicio, 2000). It's the major source of fat in the healthy Mediterranean Diet and is a very good source of natural mono-unsaturated fats and antioxidants. All the sensorial and nutritional qualities are kept on this kind of fat, thus it isn't necessary to be refined to be consumed.

Besides the major fat composition of the oil, we can find also chlorophylls, carotenes, tocopherols, polyphenols and others in considerable amounts.

Olive oil quality can be defined as a very good combination of many factors including sensory attributes, nutritional properties, absence of toxic contaminants, good manufacturing practices and chemical composition.

Due to composition variability, quality control may provide important information regarding the product's age. Major effects in variations among samples are caused by olive tree variety, seasonal conditions, soil type, harvesting time, land producer and their regional way of production.

The increasing of the world's consumption is leading to a heightening interest of the scientific community on the production of research papers covering the influences of the variances above mentioned on olive oil's production and yield. The main goal is to improve the above mentioned variable production of olive oil showing a better nutritional and chemical quality.

The spotlight is over the polyphenols' profile, with researchers trying to elucidate its antioxidant power and contribution to the olive oil's flavour. It can't be forgotten that this profile may lead to a regional identification and the denomination of regional production, named PDO.

The aim of this study was to elucidate the physic-chemical qualities of oils produced by mills in the Algarve region, in order to achieve it, 19 samples relating to the 2009, 2010 and 2011 crops were collected and frozen and later analyzed. Indent acidity and peroxide value results allowed us to classify them as virgin olive oil, and the analysis of phenolic compounds produced very impressive results and on average according to the results found in the literature. Another important factor was that we observed a good correlation between the colored compounds (CIELAB method) having good correlations between the components b^* with the amount of carotenoids and component a^* with the amount of chlorophyll.

Total Phenolic compounds found are in accordance to that reported in the literature.

Keywords: Virgin olive oil, Polyphenols, chlorophylls, carotenes, Mediterranean Diet, Algarve.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Azeite	1
1.2 Produção do azeite	4
1.2.1 Colheita e pós-colheita	4
1.2.2 Moenda	5
1.2.3 Termobatedura	6
1.2.4 Extração do Azeite	7
1.2.5 Armazenagem	8
1.3 Regiões produtoras em Portugal.....	8
1.3.1 O Algarve	11
1.4 Classificação do Azeite	13
1.4.1 Azeite Virgem	14
1.4.2 Azeite	15
1.4.3 Azeites com Denominação de Origem Protegida (DOP)	15
1.4.4 Azeites Biológicos ou de Quinta	17
1.5 O azeite e a saúde	17
1.6 Factores de qualidade.....	18
1.6.1 Acidez livre	19
1.6.2 Índice de Peróxidos e Oxidação Lipídica	20
1.6.3 Atividade Anti-oxidante	22
1.6.4 Compostos Fenólicos	24
1.6.5 Avaliação da atividade antioxidante (DPPH)	25
1.6.6 Flavonóides	26
1.6.7 Clorofilas e Carotenóides.....	27
1.6.7.4 Evolução de Cor	30
2 Objetivos.....	32
3 Materiais e métodos	33
3.1 Materiais	33

3.2 Acidez (método titulimétrico)	34
3.3 Índice de Peróxidos.....	34
3.4 Absorvência no ultravioleta	35
3.5 Estabilidade a Oxidação	36
3.6 Determinação da atividade antioxidante: preparação da amostra	37
3.7 Determinação colorimétrica dos compostos fenólicos totais.....	37
3.8 Determinação do perfil de Fenóis por Cromatografia Líquida	38
3.9 Determinação dos flavonóides totais	38
3.10 Determinação dos antioxidantes totais (TOA).....	39
3.11 Determinação do teor de antioxidantes totais pelo método do DPPH.....	39
3.12 Evolução de Cor.....	40
4 Resultados e Discussões	41
4.1 Acidez e Índice de Peróxidos	41
4.2 Absorvência no Ultravioleta	43
4.3 Estudo da Cor e Compostos de Cor	46
4.3.1 Parametros de Cor CIELAB L*, a*, e b*	46
4.3.2 Clorofilas e Carotenóides.....	48
4.4 Antioxidantes Totais.....	51
4.5 Flavonóides Totais	52
4.6 Compostos Fenólicos.....	54
4.6.1 Determinação do teor em compostos fenólicos totais.....	55
4.6.2 Perfil de Compostos Fenólicos	56
4.7 Tempo de Indução (Rancimat).....	60
4.8 IC ₅₀ , metodo DPPH	67
6. Conclusão	73
7. Propostas de trabalhos futuros.....	74
8. Bibliografia.....	75

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 : Produção e consumo mundial de azeite nas ultimas 3 safras	3
Tabela 3.1: Identificação das amostras de azeite	33
Tabela 4.1: Valores médios de acidez e índice de peróxidos, os valores representam a média e o erro padrão em triplicado.....	41
Tabela 4.2: Valores médios de K_{232} , K_{270} e ΔK , os valores representam a média e o erro padrão em triplicado	44
Tabela 4.3: ANOVA para a variável dependente como índice K_{232}	46
Tabela 4.4: Parâmetros de cor CIELAB L^* , a^* e b^* , os valores representam a média e o erro padrão em triplicado	47
Tabela 4.5: Concentração média de Clorofilas e Carotenóides, os valores representam a média e o erro padrão em triplicado	48
Tabela 4.6: ANOVA para a variável dependente Clorofilas.....	50
Tabela 4.7: ANOVA para a variável dependente Carotenóides	51
Tabela 4.8: Antioxidante Total média expressa em mg de ácido ascórbico por kg de azeite (mg/kg)	52
Tabela 4.9: Flavonóides Totais expressos em mg de Quercetina por kg de azeite (mg/Kg)	53
Tabela 4.10: Concentração média de compostos Fenólicos totais expresso em mg de ácido cafeico por kg de azeite (mg/Kg)	55
Tabela 4.11: Tempo de retenção relativo dos compostos fenólicos (em minutos)	57
Tabela 4.12: Perfil dos compostos fenólicos das amostras analisadas em mg por kg de azeite	58

Tabela 4.13: Continuação do Perfil dos compostos fenólicos das amostras analisadas em mg por kg de azeite	59
Tabela 4.14: Tempo de prateleira (shelf life) dos azeites analisados, quando armazenados as temperatura de 15 e 18 °C (em anos)	64
Tabela 4.15: ANOVA para a variável dependente tempo de indução a 110 °C (todas variáveis)	65
Tabela 4.16: ANOVA para a variável dependente tempo de indução a 110 °C (IC ₅₀).....	66
Tabela 4.17: ANOVA para a variável dependente tempo de indução a 110 °C (TOA e índice de peróxidos).....	66
Tabela 4.18: ANOVA para a variável dependente tempo de vida útil.....	67
Tabela 4.19: Valores de IC ₅₀ em g de amostra por mL de solvente e de antioxidantes equivalente de ácido ascórbico, em mg por litro de azeite	71

Índice de Figuras

Figura 1.1: Fluxograma de produção do azeite (Fonte: Curinha, 2008)	6
Figura 1.2: Imagem ilustrativa da densidade de plantação ao longo do país (Fonte: Instituto Nacional de Estatísticas, 2009)	10
Figura 1.3: O Algarve (Fonte: Blog UAlg)	12
Figura 1.4: Arvore de decisão para a classificação do azeite (Fonte: Grigoriadou & Tsimidou, 2006).....	13
Figura 1.5: Reação de desidratação do glicerol em presença de calor formando acroleína	20
Figura 1.6.: Esquema geral do mecanismo de oxidação de lipídios (Fonte: Ramalho & Jorge, 2006)	21
Figura 1.7: Estrutura química básica dos compostos flavonóides (Fonte: Garcia, 2010)	26
Figura 1.8: Estruturas químicas de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	28
Figura 1.9: Estruturas químicas α -caroteno acima e β -caroteno	29
Figura 1.10: esquema de reação para a degradação de pigmentos pela ação enzimática	30
Figura 3.1: Esquema de montagem do equipamento Rancimat.....	36
Figura 4.1: Cálculo do tempo de indução (PI período de indução)	61
Figura 4.2: Variação do tempo de Indução para amostras de azeites da colheita de 2009	61
Figura 4.3: Variação do tempo de Indução para amostras de azeites da colheita de 2009.	62
Figura 4.4: Variação do tempo de Indução para amostras de azeites da colheita de 2010	62

Figura 4.5: Variação do tempo de Indução para amostras de azeites da colheita de 2011	63
Figura 4.6: Reta de calibração padrão de inibição do radical DPPH usando soluções de ácido ascórbico.	68
Figura 4.7: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2009)	68
Figura 4.8: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2009 continuação).	69
Figura 4.9: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2010)	69
Figura 4.10: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2010 continuação).	70
Figura 4.11: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2011).	70

Lista de Siglas e abreviaturas

Abs - Absorvência

AOCS - do inglês, American Oil Chemistry Society (Sociedade Americana da Química do Oleo)

CE - Comissão Europeia

cm - Centímetro

DOP - Denominação de Origem Protegida (POD em inglês)

DPPH - 2,2'-difeníl-1-picril-hidrazilo

g - Grama

GPP - Gabinete de Políticas e Planeamento

h - Hora

HDL - do inglês , High Density Lipid (Lipído de Alta Densidade)

HPLC - do inglês, High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

IOC – International Oil Council (Conselho internacional do azeite)

kg - Kilograma

LDL - do inglês, Low density lipid (Lipído de baixa densidade)

Meq - Miliequivalente

Mg - Magnésio

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimol

nm - Nanometro

NP - Norma Portuguesa

SAU - Superfície Agrícola utilizada

UV - Ultravioleta

V - Volume

1. Introdução

1.1 Azeite

O azeite é um óleo vegetal característico líquido a temperatura de 20 °C extraído por meios mecânicos (e por vezes químicos) do fruto da Oliveira (*Olea europaea L.*) (Harwood & Aparicio, 2000). Faz parte e é a principal fonte de lipídios da saudável Dieta Mediterrânica, sendo portanto largamente utilizado em todo o Mediterrâneo. Devido ao seu aroma único e suas propriedades nutricionais (é rico em ácidos gordos mono-insaturados e anti-oxidantes naturais) veio a conquistar o paladar internacional. Pode-se ainda enfatizar que muitas das propriedades organolépticas e sensoriais (características deste produto) são mantidas no azeite virgem e extra virgem devido ao processo mecânico de extração e pelo facto de não precisar do processo de refinação para ser consumível, conservando compostos de sabor e aroma que normalmente se perdem durante as etapas químicas de extração (Aguilera, 2005).

O azeite é constituído por 98% a 99% de triglicéridos, sendo que a pequena parcela de mono- e diglicéridos no azeite são em parte derivados pelo fenómeno incompleto de biossíntese ou devido, principalmente, ao resultado de reacções de hidrólise (Boskou, 2007). Os diglicéridos são mais abundantes que os monoglicéridos e a sua análise permite aferir a frescura do azeite. A sua composição e quantidade podem fornecer importantes indicações sobre a idade de um óleo ou azeite. Deve-se salientar ainda que a composição dos ácidos gordos do azeite varia conforme a variedade da azeitona, as condições climáticas e a região produtora (Pinheiro & Mello, 2012) .

Os ácidos gordos que compõem os triglicéridos variam praticamente entre dezesseis a vinte e quatro átomos de carbono, e o ácido oleico (C18:1) é o ácido gordo predominante. O ácido oleico é um ácido monoinsaturado que confere ao

azeite propriedades importantes do ponto de vista nutricional, visto que, o azeite sendo rico neste ácido, apresenta atividade na prevenção de doenças cardiovasculares (Pinheiro & Mello, 2012).

Os restantes constituintes do azeite denominam-se micronutrientes, por se apresentarem em pequena quantidade, constituindo cerca de 0,5 % a 1,5 % dos compostos totais do azeite e um máximo de 2,5 % dos compostos totais do óleo de bagaço de azeitona. Estes compostos minoritários são os hidrocarbonetos, esteróis, alcoóis triterpenos, tocoferóis, fenóis, compostos aromáticos, compostos fenólicos polares e minerais. Os monoglicerídeos, diglicerídeos, fosfatídeos, ceras e ésteres de esteróis também são considerados micronutrientes (Harwood & Aparicio, 2000). Na composição do azeite pode-se ainda verificar uma quantidade considerável de clorofilas, carotenóides e tocoferol (vitamina E). Os dois primeiros são responsáveis pela coloração, a relação entre os seus teores confere variações entre o dourado ao verde. Ambos os compostos possuem outras funções importantes na preservação química do azeite (Boskou, 2007).

A qualidade do azeite pode ser definida como um conjunto de factores, os quais têm por base o valor nutricional, as propriedades organolépticas, a origem do produto (no caso de DOP), ausência de contaminantes tóxicos e as práticas agronómicas (Ninfali et al., 2007). As características sensoriais e nutricionais são factores que impulsionaram o crescimento do seu consumo mundial.

Devido a globalização, a qualidade do azeite foi difundida mundialmente e nos últimos vinte anos houve um grande aumento do seu consumo. Os grandes produtores encontram-se principalmente na bacia do Mediterrâneo, sendo eles a Espanha, Itália, Grécia, Portugal, Chipre e França. Portugal mantém-se no cenário mundial de grandes produtores, porém já não produz como nas décadas de 50 e 60, quando era auto-suficiente. Nos últimos anos Portugal apresentou índices de 50% de importação de azeite dos países vizinhos (dos Santos, 2011) .

Ao contrário do cenário interno, a produção e procura de azeite no cenário mundial tem aumentado ano a ano e as perspectivas de produção da safra 2011/2012, segundo a International Olive Council (IOC, 2012), é de 2.565.000 t, o

que representa um aumento de 125.000 t a mais que a produção anterior. A tabela 1.1 apresenta um resumo da produção mundial dos últimos anos.

Tabela 1.1: Produção e consumo mundial de azeite nas ultimas 3 safras (em toneladas).

safra	Produção (t)	Consumo (t)
2009/2010	2369000	2199000
2010/2011	2440000	2205000
2011/2012*	2565000	2387500

IOC, Oliveae 117, 2012. *Previsao de safra

Ainda segundo a IOC, os objetivos do órgão são de promover atividades e divulgar resultados de pesquisas científicas, visando aumentar a produtividade sem afetar a qualidade dos produtos e prejudicar o meio ambiente. Isto pode ser possível através da ajuda para modernização das áreas de cultivo e das técnicas de extração na industria do azeite.

São conhecidas cerca de 1275 variedades de azeitona, mas deste total o número de variedades de importância comercial é reduzido, no referente a produção e consumo (Luna & Aparicio, 2002) e dessa forma muitos cientistas buscam aprimorar os seus conhecimentos, principalmente no que diz respeito a produção de azeitonas para extração de azeites monovarietais, e dessa forma padronizar as suas propriedades.

Com o prévio conhecimento das propriedades de cada variedade pode-se selecionar os melhores parâmetros de produção, bem como avaliar quais as melhores misturas para que haja uma maior produção de azeites multivarietais de qualidade e com características locais únicas. Estas características locais formam um dos requisitos que pode contribuir, quando o azeite está sob investigação, para obter o certificado de denominação de origem protegida (DOP).

Deve-se ainda salientar que as pesquisas também buscam elucidar melhor as etapas de produção. Pesquisas indicam que a tecnologia adotada e cuidados nos parâmetros tecnológicos devem estar de acordo com padrões específicos e serem

bem controladas, acompanhando as etapas de produção, para evitar desperdícios e obter-se um melhor rendimento durante a etapa de extração do azeite (García-González & Aparicio, 2010). Descuidos durante a produção ocasionam, além de perda em produtividade, uma perda significativa da qualidade do azeite extraído, pois muitos compostos que contribuem para o valor nutricional decompõem-se ou são desperdiçados. Ocorre também a formação de compostos de aroma desagradável que comprometem a avaliação sensorial do produto (Custódio, 2009).

1.2 Produção do azeite

O azeite é uma gordura líquida a 20 °C obtido de forma direta do fruto da oliveira (*Olea europea L.*). É extraído por meios mecânicos e pode ou não passar por um processo de refinação, sendo este um dos factores de classificação para o mesmo. A temperatura durante o processo deve ser muito bem controlada, não podendo ultrapassar 30 °C em sistemas contínuos e 65 °C em descontínuos (Penz, 2010) .

1.2.1 Colheita e pós-colheita

Os cuidados para se obter um bom azeite iniciam-se na colheita dos frutos. O grau de maturação das azeitonas possui um carácter definitivo na qualidade final do azeite, afetando diretamente a quantidade de cloroplastos (compostos de cor), teor de ácidos gordos livres, fenóis e compostos aromáticos. Cada variedade possui o grau ideal de maturação para colheita e esta, quando bem conhecida, favorece a produção e qualidade do azeite obtido (Boskou, 2007).

Logo após a colheita devem ser aplicadas as normas de boas praticas de produção recomendadas para as azeitonas, sendo que as mesmas devem ser

processadas o mais rápido possível para evitar perdas excessivas, tanto em produção quanto em qualidade do produto obtido. Isso deve-se ao facto de que durante o transporte e o período de armazenamento do local da colheita até a zona extratora, podem ocorrer contaminações por microrganismos, que afetam negativamente a sanidade do produto final, bem como ser contaminado por sevas patogênicas, levando ao envelhecimento precoce ou conferindo aromas desagradáveis, chamados *off-flavors*, tais como odor a mofo-humidade, a vinagre e a ranço (Tsimidou, 2006).

Ainda sob o aspeto de pós colheita, pode-se enfatizar que um longo período de armazenamento pode favorecer a atividade enzimática, aumentando dessa forma a concentração de produtos de reações de degradação, resultando na libertação de compostos de cadeias menores e voláteis, bem como a degradação de triglicerídeos a monoglicerídeos (Minguez-Mosquera et al. 1990).

Torna-se, portanto, essencial que ao chegar ao lagar as azeitonas sejam o mais rápido possível selecionadas, lavadas para extrair eventuais sujidades e contaminantes e então processadas. Podendo então seguir para a moenda.

1.2.2 Moenda

Após o processo de seleção e lavagem as azeitonas são então moídas ou trituradas para se formar uma pasta. Atualmente são utilizados diferentes tipos de moinhos, sendo o mais comum o moinho de martelos. Durante esta etapa (como nas demais) o controlo do tempo e temperatura devem ser seguidos para proporcionar um maior rendimento de extração, bem como evitar perdas por degradação pela atividade enzimática, pois as enzimas intracelulares são agora libertadas para o meio externo, devido a ruptura da parede celular, estando portanto em contato com o substrato a ser hidrolisado. Esta pasta assim obtida segue para a próxima etapa do fluxograma de processo (figura 1.1) que é denominada Termobatedura.

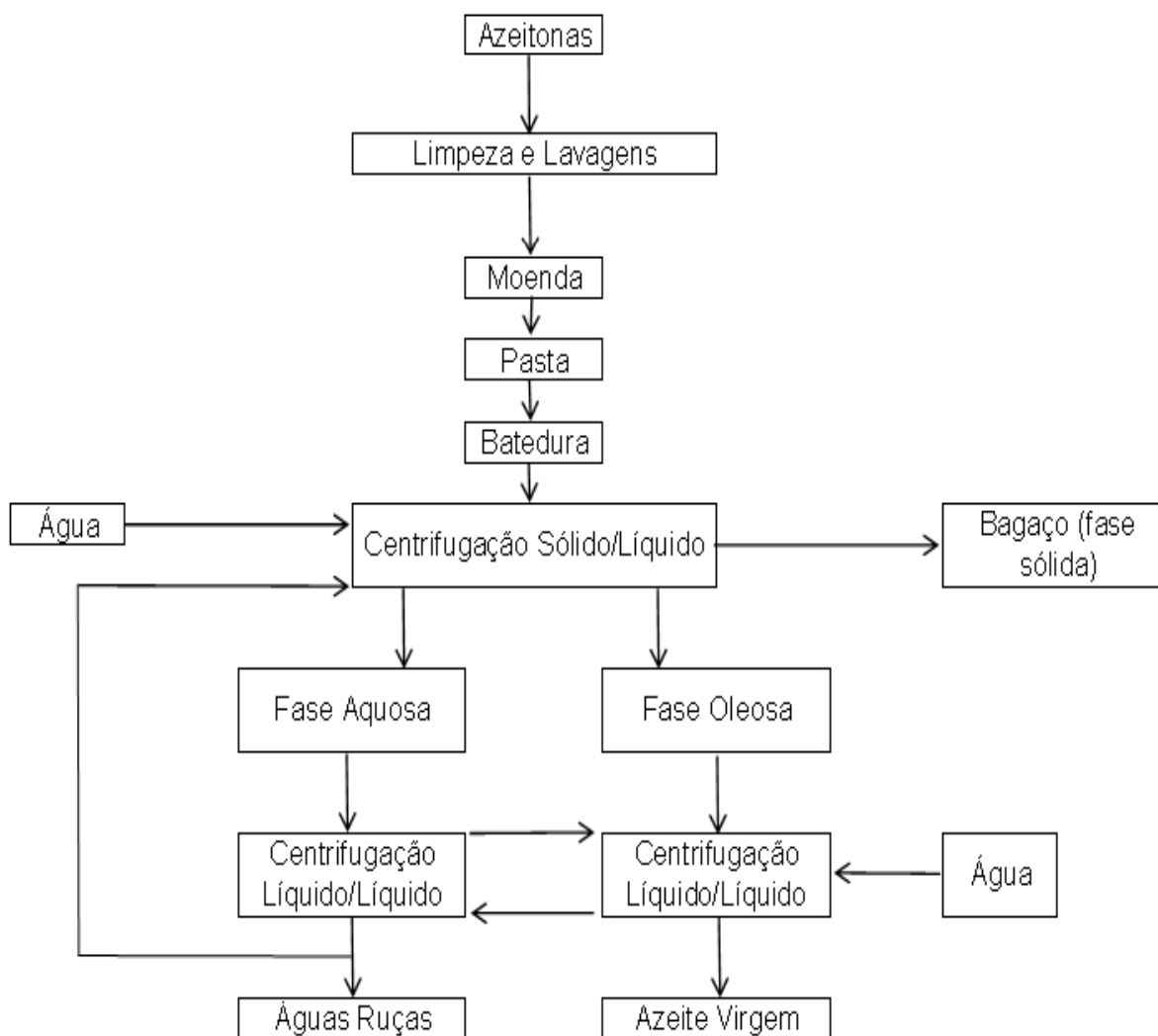


Figura 1.1: Fluxograma de produção do azeite. Fonte: (Curinha, 2008)

1.2.3 Termobatedura

O aquecimento durante a batedura tem por finalidade aumentar a eficiência da extração do azeite, uma vez que o leve aumento da temperatura favorece a formação de gotas maiores no meio da emulsão com a água, favorecendo dessa forma a sua separação por meios mecânicos. Por outro lado, o aumento excessivo da temperatura neste estágio pode favorecer o aumento das reações enzimáticas, prejudicando as propriedades sensoriais e nutricionais do azeite, ocasionando

perdas em compostos fenólicos, afetando as características nutraceutricas do produto final, bem como favorecer o controlo da propagação de reações em cadeia como as de peroxidases, hidroxilases e oxidação lipídica, formando por exemplo ácidos livres e dienos conjugados , que afetam diretamente o aumento da acidez, índice de peróxidos e absorbância no UV do produto final, diminuindo conseqüentemente o seu tempo de prateleira. Sendo assim, os parâmetros tecnológicos tempo e temperatura são fundamentais, pois afetam diretamente não somente a eficiência de produção, mas também a qualidade sensorial e química do produto final obtido (Ranalli, Pollastri, Contento, Iannucci, & Lucera, 2003).

Este binómio tecnológico, tempo e temperatura, deve ser estabelecido de acordo com a variedade da qual se esta extraíndo o produto, pois cada variedade possui um conjunto de compostos variáveis passíveis de perda durante o processo, sendo que estes podem ser mais ou menos resistentes a temperatura, sendo portanto de extrema valia o conhecimento da composição química de cada variedade (Ranalli et al., 2003).

1.2.4 Extração do Azeite

A etapa seguinte é portanto, aquela em que ocorre a separação da fase oleosa, sendo então descartado o bagaço e a fase aquosa denominada água ruça. Atualmente o método mais utilizado para a separação do azeite é a centrifugação, muito disseminado com o advento da tecnologia, sobrepondo-se aos métodos antigos de pressão e percolação. A extração ocorre em centrifugas de alta rotação onde serão separadas as três fases: o bagaço (sólido), a fase oleosa e a fase aquosa, sendo a fase oleosa de interesse, novamente centrifugada para elevar o grau de pureza e diminuir a acidez pela passagem de água e arraste de compostos hidrossolúveis. As fases sólida (bagaço) e aquosa (água ruça) são descartadas (IOC, 2007) .

Atualmente pesquisadores buscam alternativas de produção com o objetivo de diminuir os impactos ambientais desses resíduos gerados durante a produção, pois a cada ano que passa as normas ambientais estão cada vez mais rígidas no tocante a produções eficientes e não poluentes. Deste modo, novas tecnologias de produção aplicadas a esses dejetos favorecem a utilização crescente destes como sub-produtos (García-González & Aparicio, 2010).

Os métodos de extração mais modernos utilizam a extração em duas fases, diminuindo a produção de água ruça e consequente obtenção do bagaço húmido que é utilizado para extração de óleo do bagaço. Já existem formas de utilização da água ruça na irrigação e adubagem de solo; Porém neste caso existem algumas restrições legais quanto a dosagem utilizada (García-González & Aparicio, 2010).

1.2.5 Armazenagem

Finalizada a extração, o produto é então embalado em recipientes que assegurem a sua integridade durante o período de maturação. Esta embalagem deve oferecer proteção em relação a factores externos, para evitar contaminações microbiológicas e a propagação de reações indesejadas, causadas pela presença de luz e oxigénio. Após o envase o produto deve ser armazenado a temperaturas entre 15 e 18° C, idealmente para evitar a degradação prematura do produto (IOC, 2007).

1.3 Regiões produtoras em Portugal

Portugal nas décadas de 50 e 60 produzia acima de 100 % do azeite necessário para consumo interno. Com o passar das ultimas décadas essa produção diminuiu para um patamar em torno de 60%, sendo que o restante foi então suprido pelo mercado internacional, sendo o principal fornecedor a Espanha (dos Santos, 2011).

Paralelamente Portugal ainda mantém abastecidos mercados externos, mantendo como principais compradores o Brasil, a Venezuela, os Estados Unidos da América e o Canadá.

Segundo o Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP), entre as várias atividades agrícolas do país, a olivicultura ocupa uma área de 376300 ha do território nacional, representando 10,1 % da Superfície Agrícola Utilizada (SAU) em Portugal. Com incentivos de órgãos governamentais e o aquecimento do mercado internacional, observou-se um crescente interesse por esta cultura nos últimos anos, tornando a olivicultura num sector atrativo e economicamente viável (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2007).

A cultura do olival encontra-se distribuída por todas as Regiões Agrárias do Continente, destacando-se o Alentejo e Trás-os-Montes como principais regiões produtoras, com alguma supremacia do Alentejo em termos de área (Alentejo – 41,7% e Trás-os-Montes – 20,8%). As regiões da Beira Interior e Ribatejo e Oeste posicionam-se na segunda linha do ranking da produção nacional, com uma ocupação de, respectivamente, 17,9% e 11,3%, O Algarve segue com 2,6% e a região entre o Douro e Minho com 0,3%. Dados de área de produção e densidade produtiva dos olivais podem ser observados na figura 1.2, que ilustra toda área de plantio nacional (dos Santos, 2011) .

No Algarve o olival tem expressão pouco significativa, nomeadamente na especialização olival, a área é de 8718 hectares, sendo que o olival representa 14,3 % da superfície agrícola utilizada da região (Instituto Nacional de Estatística, 2009).

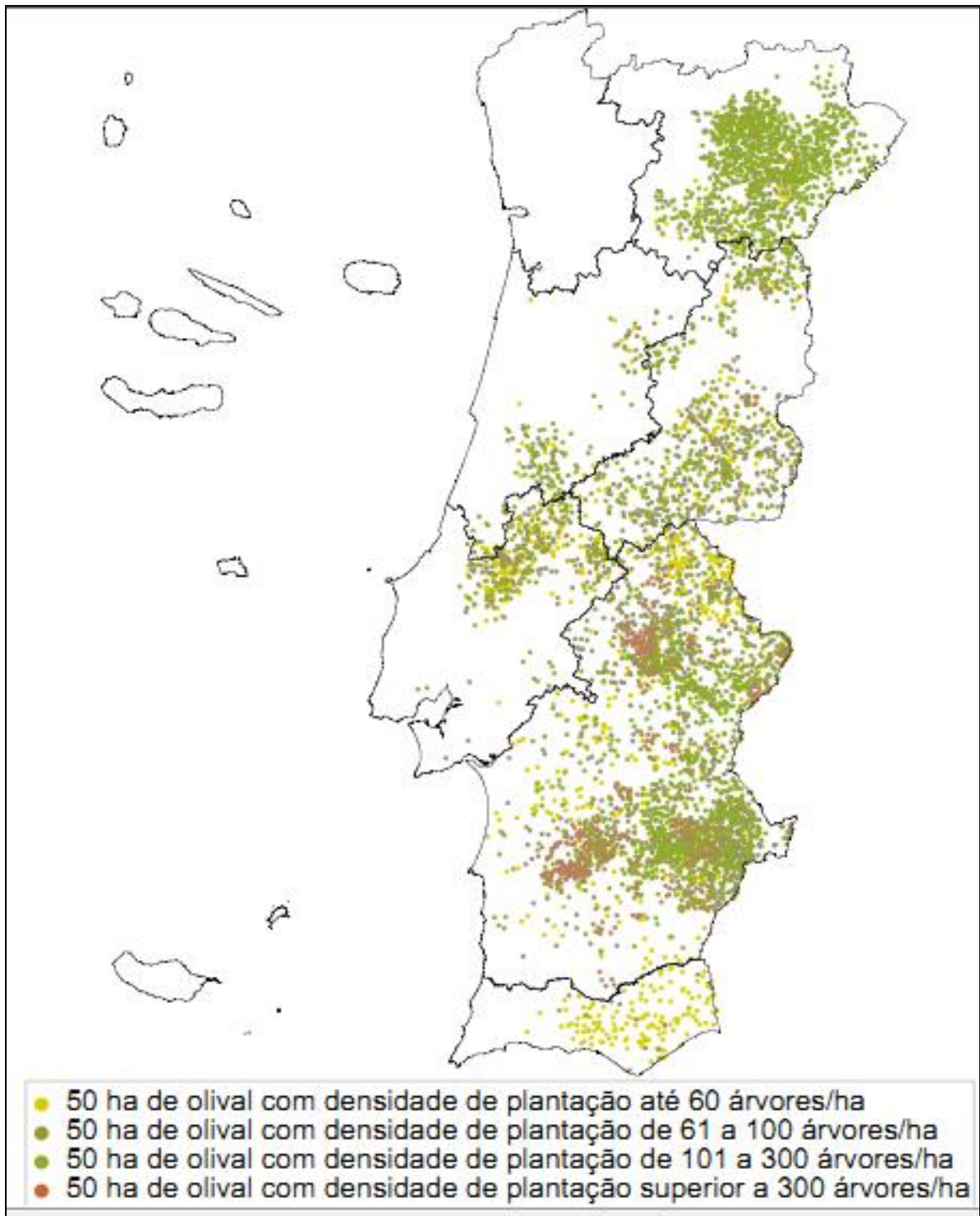


Figura 1.2: Imagem ilustrativa da densidade de plantação ao longo do País (Instituto Nacional de Estatística, 2009)

Diferentemente de outras regiões do País, onde a variedade Galega predomina, acima dos 50%, no Algarve destaca-se o plantio da variedade Maçanilha Algarvia (cerca de 80%), o que confere especificidade característica ao azeite produzido na região. Esta variedade é considerada rústica pela sua tolerância ao frio, à seca e à salinidade. A produtividade dessa variedade é média e alternada. A época de maturação também é média e os seus frutos são pouco resistentes ao desprendimento, o que contribui para a colheita mecanizada. Ela é utilizada tanto para obtenção de azeite, pelo seu elevado rendimento, como para azeitona de mesa, verdes ou maduras devido ao tamanho e calibre dos seus frutos. Apresenta dificuldades tecnológicas de produção devido a resistência a separação da polpa do caroço. Dentre as pragas agrícolas, é susceptível à tuberculose, lepra e mosca da azeitona (Sovena Group, 2012).

1.3.1 O Algarve

Apesar de banhado pelo Atlântico, o clima do Algarve é temperado, de características Mediterrânicas, influenciado pela proximidade do Mediterrâneo e Norte de África. O clima ameno resulta da influência mediterrânica e da topografia. Os invernos são suaves enquanto os verões são quentes, muito secos e prolongados. A precipitação concentra-se nos meses de inverno e é nas serras de Monchique e Caldeirão que se registam os valores mais elevados. Geograficamente podem-se distinguir três regiões no Algarve: o litoral, o barrocal e a serra, cada uma com características específicas, produções e realidades próprias (PROT Algarve, 2006). Estas regiões podem ser visualizadas na figura 1.3, que apresenta um mapa do Algarve.

A serra situa-se a norte da região, até à fronteira com o Alentejo, o que foi desde sempre considerado como uma forte barreira natural que separou o Algarve do resto do país (região com coloração castanha na figura 1.3). Quanto à floresta e vegetação, impera o mato de esteva, tojo, rosmaninho e também eucaliptos e pinheiros.

seus sapais, ilhas e cordões arenosos que a protegem do oceano. São numerosas as espécies de flora e fauna, sendo um importante centro produtor de moluscos e bivalves (PROT Algarve, 2006).

1.4 Classificação do Azeite

A Comissão Europeia é responsável pelos parâmetros destinados a classificação do azeite sendo estes estabelecidos e presentes no regulamento CE nº 2568/91. Este propõe que se deve utilizar uma árvore de decisão para a classificação final do produto obtido. Este critério tem como base os valores obtidos nos ensaios de percentagem de acidez, o índice de peróxidos, nas absorvências no ultravioleta e na análise sensorial. Um resumo esquemático pode ser observado na figura 1.4, bem simplificado e de muito valia ao produtor na hora da classificação.

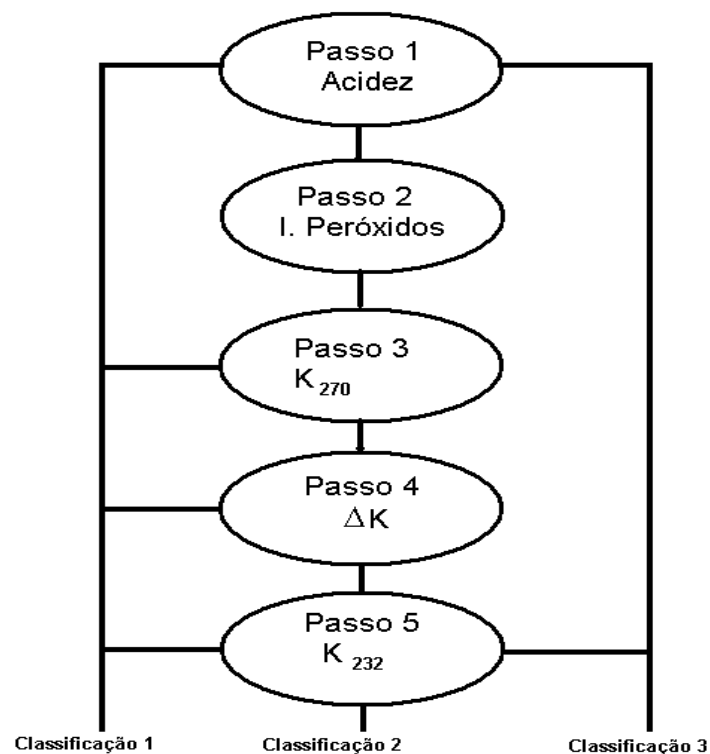


Figura 1.4: Árvore de Decisão para a Classificação do Azeite. (Fonte: Grigoriadou & Tsimidou 2006)

A acidez do azeite tem carácter definitivo quando ocorre a classificação, sendo este o factor de divisão entre as denominações dos azeites (como citado a seguir). Outro factor de importância é a análise sensorial, sendo de importância para a aceitabilidade pelo consumidor final. Os índices de peróxidos e absorvências no UV, não são utilizados para classificar os azeites nas diferentes denominações, Porém devem apresentar valores dentro dos padrões permitidos pela legislação para que o azeite possa ser aceite para consumo, pois são indicadores de qualidade e sanidade.

1.4.1 Azeite Virgem

Para obter esta denominação, o azeite deve ser obtido apenas por processos físicos, o que significa que durante a produção a operação unitária de refinação não pode ser realizada. Porém a classificação final será realizada de acordo com o grau de acidez apresentado após a extração. Seguindo este critério, o azeite obtido pode ainda ser subdividido em outras 4 classificações de acordo com o valor em percentagem de acidez apresentado e o resultado da análise sensorial. Nos parágrafos seguintes podemos observar os critérios de classificação conforme os valores de acidez expressos em ácido oleico, para que o produto possa ser classificado dentro de uma das denominações existentes (C. Europeia, 2011):

- *Azeite extra virgem*: Quanto o produto final obtido possui uma acidez de até 1% e apresenta características organoléticas agradáveis ao paladar

- *Azeite virgem*: O azeite deve apresentar características organoléticas agradáveis ao paladar e uma acidez máxima de até 2%;

- *Azeite corrente*: Recebe esta denominação quando ocorre algum eventual aumento da acidez e este valor atinge até um máximo de 3,3%, Porém o produto final ainda deve apresentar características sensoriais aceitáveis pelo consumidor;

- *Azeite lampante* : É o azeite que apresenta um gosto defeituoso e acidez até 3,3%. Segundo a legislação vigente este produto não poderá ser comercializado (C. Europeia, 2011).

1.4.2 Azeite

Uma outra classificação leva em consideração os produtos que durante a extração apresentam características que levam à necessidade da etapa adicional de refinação, sendo neste caso dividido em outras duas subclassificações:

- *Azeite*: quando azeite refinado é misturado a uma quantidade de azeite virgem (excluindo-se a classe lampante) e apresenta uma acidez máxima de 1,5% em ácido oleico e;

- *Azeite refinado*: é aquele que passou por um processo de refinação, sem mistura e apresenta uma acidez em ácido oleico não superior a 0,5%.

1.4.3 Azeites com Denominação de Origem Protegida (DOP)

Apenas os azeites virgem e extra virgem podem ser candidatos à obtenção da certificação DOP. O Azeite com denominação de origem é um azeite com história, com reputação e notoriedade, que apresenta um modo de produção local, leal e constante ao longo dos tempos, apresentando características qualitativas intrinsecamente ligadas à região ou local onde tem a sua origem. O uso da Denominação de Origem obriga a que o azeite seja produzido de acordo com as regras estipuladas num caderno de especificações, o qual inclui variedades de azeitona, condições de apanha e transporte para o lagar, condições de laboração e as características do produto final (CE 510/2006, 2006).

A região que obtém essa certificação é delimitada por uma área geográfica específica, deve apresentar uma combinação única de solo e clima e ainda cultivar azeitonas de determinadas variedades. A tipicidade de cada região ainda deve ser comprovada através de ensaios analíticos assegurando a qualidade química e sensorial dos azeites, bem como meios de distingui-los de outros.

Portugal possui 6 regiões produtoras com certificações DOP, são elas: Moura, Trás-os-Montes, Beira Interior, Norte Alentejano, Alentejo Interior e Ribatejo. Essa classificação é obtida segundo os critérios estabelecidos pela Comissão Europeia, nominalmente apresentando características enumeradas no regulamento CE nº 510/2006 o qual apresenta uma lista de especificações a serem cumpridas para a obtenção deste certificado, sendo citadas abaixo estes requisitos.

- Só devem ser utilizadas as azeitonas colhidas nas árvores, sãs e em plena maturação;

- O transporte até ao lagar deve ser feito o mais rapidamente possível após a colheita, e em recipientes de tamanho médio que permitam boa circulação de ar;

- As azeitonas devem estar limpas e lavadas, sendo que o período entre a lavagem e a moenda não deverá ultrapassar 24 horas;

- A pasta deve ser moída e batida a uma temperatura máxima de 30° C, durante 25 a 30 minutos nos sistemas clássicos de prensas e 50 minutos nos sistemas de centrifugação;

- O azeite deverá ser armazenado em recipientes a 15 a 16° C para decantação dos sólidos (borra) que resultam do processo de extração;

- Devem-se efetuar periodicamente transferências para evitar a contaminação do azeite pelos aromas e sabores estranhos provenientes da borra;

- O azeite deverá ser embalado em garrafas de vidro entre 18 e 20° C;

- Todo o material e equipamento em contato com a pasta de azeitona e o azeite está revestido de material inerte.

1.4.4 Azeites Biológicos ou de Quinta

Uma caracterização ainda pouco difundida diz respeito ao modo de plantio e produção, denominadamente agricultura biológica ou de quinta.

Essa é uma classificação de azeites de pouca expressão comercial, uma vez que o modo de produção é basicamente a nível artesanal e de nicho de mercado específico. Segundo a regulamentação da Comissão Europeia os azeites recebem a denominação Biológico quando produzidos sem a utilização de fertilizantes ou produtos químicos sintéticos, sendo efetuada a manutenção dos solos por meio de fertilização natural, rotatividade adequada e ainda obedecendo aos critérios sanitários. Quando a produção é totalmente realizada dentro da própria área de plantio, ou seja na quinta, esse azeite pode então ser denominado Azeite de Quinta.

1.5 O azeite e a saúde

O azeite é um dos principais ingredientes da Dieta Mediterrânica, que apresenta uma relação inversa com a presença de doenças cardio-vasculares da população dessa região. Esse efeito protetor e preventivo é em grande parte atribuído à composição única desse óleo, que possui um elevado teor de ácidos gordos monoinsaturados e de compostos fenólicos, especialmente oleuropeína (Bendini et al., 2007) e o hidroxitirosol, compostos estes encontrados no azeite devido a sua peculiaridade de ser consumível sem necessidade de refinação (Pimentel, Magnoni & Costa, 2007).

É uma fonte de gordura monoinsaturada usada em detrimento de gorduras animais monoinsaturadas, como a manteiga e gorduras vegetais como a margarina. Constitui assim um duplo efeito protetor contra doenças

cardiovasculares, pois além das suas características, evita o consumo de outros tipos de gordura nocivas à saúde. É também uma fonte de antioxidantes, incluindo a vitamina E, que favorece o aumento do *HDL* (do inglês *High density lipid* – Lipido de alta densidade) o “bom colesterol” e a redução do *LDL* (do inglês *Low density lipid* – lipido de baixa densidade) o “mau colesterol” (Bendini et al., 2007).

Nos últimos anos, é crescente o número de estudos que apresentam evidências de que nutrientes e substâncias não-nutrientes contidas em diferentes alimentos, como o azeite, podem interferir de modo positivo na prevenção de enfermidades (Pimentel, Magnoni & Costa, 2007). Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que o azeite extra-virgem, com alto teor de compostos fenólicos, exerce um papel protetor contra doenças crónico-degenerativas, inclusive a arterosclerose, pelo alto conteúdo de gorduras monoinsaturadas (ácido oleico). O azeite possui ainda compostos que exercem um efeito protetor contra a artrite reumatoide, efeito antiinflamatório, além de evidências de um efeito protetor contra alguns tipos de cancro e aumento da longevidade (Bendini et al., 2007).

1.6 Factores de qualidade

A qualidade de um produto é definida como um conjunto de atributos e características que conferem o grau de aceitabilidade pelo consumidor final. Diferentes produtos, sejam alimentícios ou não, possuem características próprias que devem ser avaliadas de acordo com procedimentos padronizados pelo órgão competente. No caso de produtos alimentares existem diversos sistemas e órgãos de qualidade que tem por finalidade garantir que o produto final esteja de acordo com os padrões estabelecidas por Organismos Internacionais respeitando a sanidade, higiene, qualidade e autenticidade de cada alimento.

As Normas Portuguesas seguem os critérios estabelecidos pela Comissão Europeia para conferir a qualidade e classificação dos azeites produzidos em território nacional. Segundo estas normas, os requisitos de qualidade estabelecidos

para azeite são: índice de acidez titulável expressos em ácido oleico, índice de peróxidos expressos em meq O₂/Kg, os valores das constantes K de absorção no ultravioleta nos comprimentos de onda $\lambda=232$ nm e $\lambda=270$ nm, denominadamente K₂₃₂ e K₂₇₀, a variação entre os comprimentos de onda $\lambda=266$ nm e $\lambda=274$ nm em relação ao K₂₇₀ denominado ΔK . Ainda deve ser considerado a análise sensorial como requisito final de qualidade (CE 1989, 2003).

Outros métodos podem ainda ser aplicados para garantir a qualidade, sendo eles: a determinação da estabilidade oxidativa, que avalia o tempo de prateleira; o teor total de compostos fenólicos que está diretamente ligada à estabilidade oxidativa juntamente com outros compósitos como clorofilas e carotenóides. Para estes últimos existem ainda método para a determinação de cor e sabor, uma vez que também são responsáveis por características organolépticas do produto.

Diversos estudos publicados referem este assunto (Tripoli et al., 2005 ; Giuffrida et al., 2007; Hayes et al., 2011), o que nos permite levantar um considerável banco de dados dos compostos presentes nos azeites produzidos nas diversas regiões do mundo mediterrânico, a maior região produtora devido às suas características ótimas para o cultivo de azeitonas.

Os artigos relacionados mostram claramente que grupos de pesquisas buscam avaliar as características locais dos azeites, buscando dessa forma encontrar condições ideais de cada região para melhorias no quesito qualidade e produtividade.

1.6.1 Acidez livre

Segundo o Regulamento EU N^o 61/2011 da Comissão Europeia, o índice de acidez é a quantidade em massa de hidróxido de potássio expressa em miligramas, necessária para neutralizar os ácidos gordos livres contidos em 1 grama de gordura ou óleo, que no caso dos azeites deverá ser expresso em relação ao ácido oleico. Tem origem na quebra hidrolítica de lipídios presentes (tri e di) resultando em ácidos

gordos livres, podendo também resultar da síntese incompleta dos mesmos (Boskou, 2007).

Dentre os factores que afetam a qualidade do azeite, a acidez tem um papel fundamental, uma vez que é nela que a divisão entre as categorias de azeite se baseia. Para controlar o conteúdo de ácido livre, deve-se proceder à colheita das azeitonas em estado de maturação adequado e controlar o processo de extração do azeite, uma vez que ocorre a libertação de enzimas lipolíticas intracelulares durante o processo (Boskou, 2007).

1.6.2 Índice de Peróxidos e Oxidação Lipídica

O sabor e cheiro desagradável em óleos e gorduras estão normalmente associados à rancidez, que é caracterizada por uma reação hidrolítica de quebra dos triglicerídeos e libertação de ácidos gordos livres. Este tipo de reação (natural em lípidos) pode decorrer da ação de microrganismos ou enzimas naturais dos alimentos, podendo ser acentuada pela ação do calor, levando à quebra do glicerol e tendo como produto a acroleína (2-propenal), composto este de cheiro desagradável e irritante para os olhos, mucosas e a pele. A figura 1.5 ilustra a reação de formação da acroleína em óleos na presença de calor (Bobbio e Bobbio 2003).

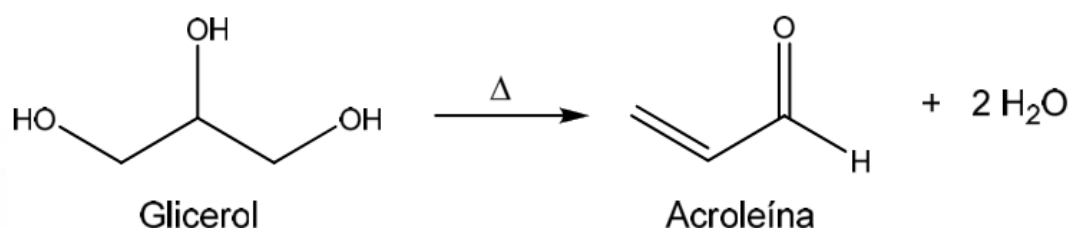


Figura 1.5: Reação de desidratação do glicerol em presença de calor formando acroleína.

Alem do efeito sobre os compostos, a oxidação lipídica tem um papel fundamental na perda nutricional dos alimentos durante o período de armazenamento, pois toma parte da degradação oxidativa de vitaminas, compostos

carotenóides, proteínas e outros compostos passíveis de oxidação presentes no azeite (Ryan & Robards, 1998).

Os processos de oxidação em alimentos ocorrem de forma natural ao longo do tempo. Porém, métodos de conservação podem ser utilizados para evitar o envelhecimento precoce, prolongando assim o tempo de prateleira dos alimentos gordurosos. Dentre estes cuidados pode-se citar o uso de embalagens e armazenagem em locais adequados ao abrigo da luz e frescos, visando assim diminuir a incorporação de oxigénio, prevenir o aumento da temperatura e desfavorecer a penetração de luz no produto, pois estes factores aceleram o processo de oxidação.

A reação de oxidação (esquema representado na figura 1.6) inicia-se com a remoção de um protão (H^{\cdot}) de um grupo metileno (CH_2) de um ácido gordo insaturado (RH), levando à formação de um radical livre (R^{\cdot}), reação esta que se acentua à medida que ocorre um aumento da temperatura, pois este tipo de reação tem uma elevada energia de ativação. Seguindo para uma segunda etapa, a qual se denomina propagação: nesta etapa ocorre uma adição de oxigénio ao radical livre formado, dando origem a um produto denominado radical peróxido (ROO^{\cdot}) que continua a reação em cadeia retirando um protão de lipídios insaturados, convertendo-os em hidroperóxidos ($ROOH$), que são subsequentemente degradados. Inicia-se então uma nova etapa que se chama propagação, sendo esta muito rápida, uma vez que os radicais livres formados são bastante reativos, iniciando a decomposição do alimento (Bobbio e Bobbio, 2003).

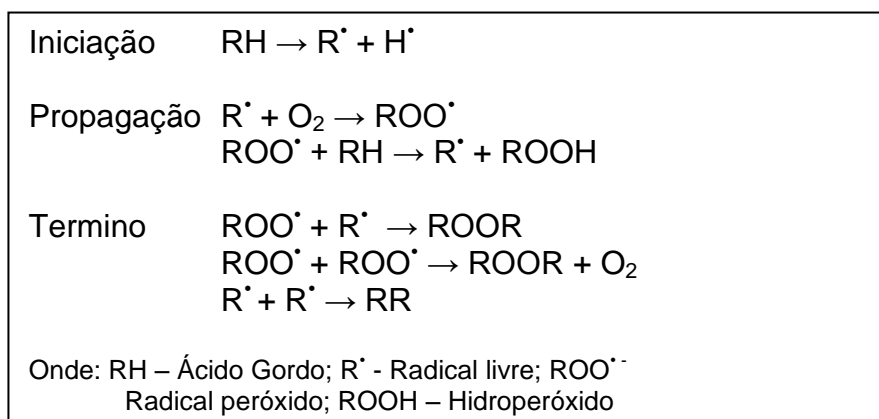


Figura 1.6: Mecanismo de oxidação de lipídios (Ramalho & Jorge, 2006)

1.6.2.1 Absorvência no Ultravioleta

Dienos Conjugados

A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados ocorre com formação de hidroperóxidos e deslocamento das duplas ligações, com conseqüente formação de dienos conjugados, sendo que estes absorvem luz ultravioleta no comprimento de onda $\lambda=232$ nm. Porém produtos secundários desta reação de oxidação, nomeadamente as α -dicetonas ou as cetonas insaturadas, apresentam um máximo de absorção a $\lambda=272$ nm. Esta diferença permite avaliar o estado oxidativo com base na relação entre estas absorvências (A_{272}/A_{232}). Quando observado um valor alto da absorvência em $\lambda=232$ nm, isto será um indicativo de alta concentração de peróxidos. O contrario é observado se o azeite analisado apresentar um valor de absorção a $\lambda=272$ nm elevado, pois este comprimento de onda relaciona-se com os produtos secundários da oxidação. Os peróxidos são intermediários instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas ou em presença de metais de transição (Tanouti et al., 2010).

Segundo a Norma Portuguesa (NP 970,1986), as absorvências ou densidades de transmissão no ultravioleta são essencialmente índices de alteração de uma gordura ou óleo. A determinação espectrofotométrica da absorvência interna de uma gordura, ou de óleo, se dá em iso-octano em concentração de 1g em 100 cm³, em bandas de absorção próximo ao visível, seja para conjugações dienicas a $\lambda=232$ nm ou trienicas a $\lambda=270$ nm, uma vez que (como já descrito acima) os trienos são produtos secundários de oxidação apresentam um máximo de absorção entre 268 e 272 nm (NP 970,1986).

1.6.3 Atividade Anti-oxidante

A oxidação é um processo biológico natural para produção de energia em seres vivos. Contudo, o excesso de formas reativas de oxigênio produzidas em organismos vivos, nem sempre estão associadas com a peroxidação lipídica, mas também associadas ao desenvolvimento de doenças degenerativas, como o cancro

(Luo et al., 2010). Nas últimas décadas estudos provaram a importância de uma dieta com alimentos ricos em antioxidantes naturais para a manutenção da saúde e prevenção de complicações durante o envelhecimento (Tripoli et al., 2005; Tuck & Hayball, 2002; Wiseman et al., 1996).

Antioxidantes são, de forma geral, substâncias que embora presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis, ou podem ser reciclados por outro antioxidante (Sousa et al., 2007). Eles retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ainda ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde.

Dentre os antioxidantes naturais mais importantes destacam-se o ácido ascórbico, o β -caroteno e a vitamina E. Os compostos fenólicos também apresentam uma potente ação antioxidante (Duarte-Almeida et al., 2006).

Antioxidantes são conhecidos por agir em níveis diferentes na sequência de oxidação envolvendo lipídios. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Sousa et al., 2007).

A presença de importantes antioxidantes naturais em alimentos vegetais atrai grande interesse, devido aos benefícios como agentes anticarcinogênicos e inibidores de reações biológicas de oxidação, nocivas ao corpo humano. Uma variedade de compostos fenólicos já foram identificados em azeites extra virgem, sendo os mais abundantes os derivados de 3-4-dihidroxifenil etanol (hidroxitirosol) e p-hidroxifenil etanol (tirosol) (Nissiotis & Tasioulamargari, 2002).

Diversos trabalhos demonstram a atividade antioxidante de compostos fenólicos em azeites, sendo que a estabilidade oxidativa dos azeites virgens se correlaciona principalmente com a concentração de fenóis hidrofílicos (Bendini et al., 2007).

Azeites virgens apresentam normalmente uma concentração de fenóis de 50 a 500 mg/kg (Tanouti, Elamrani, & Tahani, 2011), sendo que como já citado, estas variações estão relacionadas com diversos factores, nomeadamente condições de crescimento, clima, colheita e processo de extração.

O estudo de compostos fenólicos totais é normalmente realizado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e vários autores reportam diferentes métodos cromatográficos para o estudo dos compostos fenólicos individuais, utilizando a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). (Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Cioffi et al., 2010; Kotsiou, Tasioula-Margari, Capuano, & Fogliano, 2011).

1.6.4 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são agentes antioxidantes naturais e um factor importante a considerar na avaliação da qualidade de um azeite extra virgem, uma vez que são responsáveis pela estabilidade oxidativa e conferem algumas das características organoléticas (Ryan & Robards, 1998).

Azeites obtidos de azeitonas de boa qualidade não necessitam da etapa de refinação para serem consumidos. Desta forma são mantidos compostos fenólicos que não estão presentes em outros óleos, pois com o uso de solventes, boa parte dos fenóis são perdidos, dissolvidos no solvente (Tasioula-Margari, 2001).

A contribuição dos compostos fenólicos para o tempo de prateleira do azeite tem sido investigada e a relação entre a estabilidade oxidativa e a sua concentração nos óleos já é bem conhecida (Benito et al., 2012). Os fenóis são os principais agentes responsáveis pela resistência à auto-oxidação e foto-oxidação. A presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante é de importância já que estão

correlacionados com a resistência ao desenvolvimento da oxidação lipídica. As propriedades antioxidantes dos fenóis são devidas às suas propriedades Redox, as quais lhes permitem atuarem como agente redutores, doadores de hidrogénio e supressores de oxigénio singlete (Benito et al., 2012).

1.6.5 Avaliação da atividade antioxidante (DPPH)

Os chamados “ensaios armadilha” (Trap Assays) são assim denominados pois capturam os radicais livres gerados. Existem conjuntos de testes de inibição destinados à avaliação da capacidade de desativação de radicais livres “gerados” *in vitro*. Os métodos propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais livres gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para a sua deteção e quantificação. Na maioria dos casos recorre-se à formação de radicais instáveis, pela decomposição térmica de um grupo funcional $N\equiv N$, os quais reagem rapidamente com o oxigénio originando radicais peróxido. Estes atuam sobre um substrato lipídico (ácido linoleico ou um dos seus ésteres) desencadeando um processo de lipoperoxidação, em relação ao qual se escolhe um determinado indicador (consumo de oxigénio, desaparecimento do substrato lipídico, aparecimento de produtos de oxidação) que se observa e quantifica antes e após a adição de um composto antioxidante (avaliação da atividade sequestrante do radical) (Sucupira et al., 2012).

Porém existe um outro método proposto, o qual não recorre à oxidação de substratos lipídicos, pelo contrário, a reação é de redução de radicais livres estáveis gerados *in vitro*, como resultado da atividade de sequestro de radicais de compostos antioxidantes. O método de Brand-Williams et al., (1995) tem por base a redução do radical 2,2'-difeníl-1-picril-hidrazilo (DPPH), o qual apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda $\lambda=515$ nm. Ao fixar um H^{\bullet} , abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorvência, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH, inicialmente presente na solução (Brand-Williams et al., 1995). Trata-se de um teste rápido, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (Sucupira et al., 2012).

1.6.6 Flavonóides

O grupo químico dos flavonóides é composto por cerca de 4000 compostos naturais, os quais são sintetizados em plantas e se encontram presentes nos mais diversos alimentos. Dentre eles, podem-se citar os vegetais, as frutas, os legumes, o vinho, o azeite, etc. São um grupo de compostos com atividades benéficas para a saúde, destacando-se doenças degenerativas que levam ao envelhecimento das células, sendo que este efeito deve-se à sua capacidade anti-oxidante (Garcia, 2010).

A estrutura básica dos flavonóides basea-se numa forma comum (figura 1.7), a 2-hidroxicalcona, que possui dois anéis aromáticos (A e B) ligados por 3 átomos de carbono (figura 1.7). A partir dessa estrutura ocorre a oxidação e a adição de oxigénio no carbono 6 do anel A e o carbono 2 da estrutura de ligação, formando um terceiro anel C. Desta nova estrutura se formam todos os outros compostos e a classificação destes é baseada no padrão de oxidação e substituintes do anel C (Garcia, 2010).

Existem 7 classes de flavonóides: Flavanóis ou catequinas, antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e neoflavonóides. No azeite a predominância dá-se do grupo Flavonóis no qual o anel C é uma pirona, ou seja possui uma ligação dupla com oxigénio no carbono 4, possui uma dupla ligação C2=C3 e um grupo 3-OH (Garcia, 2010) .

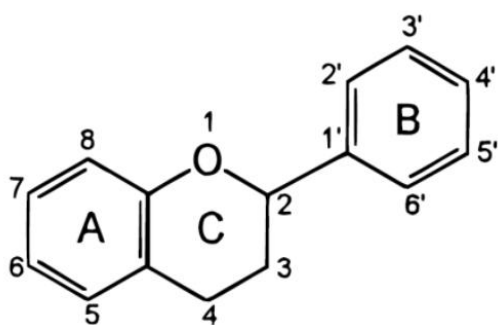


Figura 1.7: Estrutura química básica dos compostos flavonóides

(Fonte: Garcia, 2010).

1.6.7 Clorofilas e Carotenóides

Estudos de cor são de extrema importância para a indústria de alimentos em geral, uma vez que este é um dos primeiros requisitos de qualidade observados pelo consumidor na hora da compra. Por esse motivo existem critérios específicos em análise sensorial e análise química para avaliar e quantificar estes compostos, bem como a aceitação desses produtos no mercado. No caso do azeite não seria diferente, sendo que os pigmentos que dão a cor à azeitona e ao azeite são as clorofilas (figura 1.8) e carotenóides (figura 1.9) (Moyano et al., 2010).

1.6.7.1 Clorofilas

A clorofila é um pigmento natural verde encontrado em cianobactérias e cloroplastos de algas e plantas. O nome vem do grego e significa folha verde. A clorofila é uma biomolécula de extrema importância para as plantas, fundamental para a realização da fotossíntese, que permite as plantas produzirem o seu próprio alimento através da absorção da luz e consequente transferência dessa energia para os centros reativos da clorofila durante o período claro, produzindo moléculas orgânicas a partir de CO_2 e água, libertando oxigênio para a atmosfera. Está ligada à eficiência fotossintética de plantas e consequentemente ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes. A clorofila é constantemente sintetizada e destruída (foto-oxidação) em presença de luz, mas sob intensidades luminosas muito altas a velocidade de decomposição é maior, sendo o equilíbrio estabelecido a uma concentração mais baixa (Berg et al., 2002).

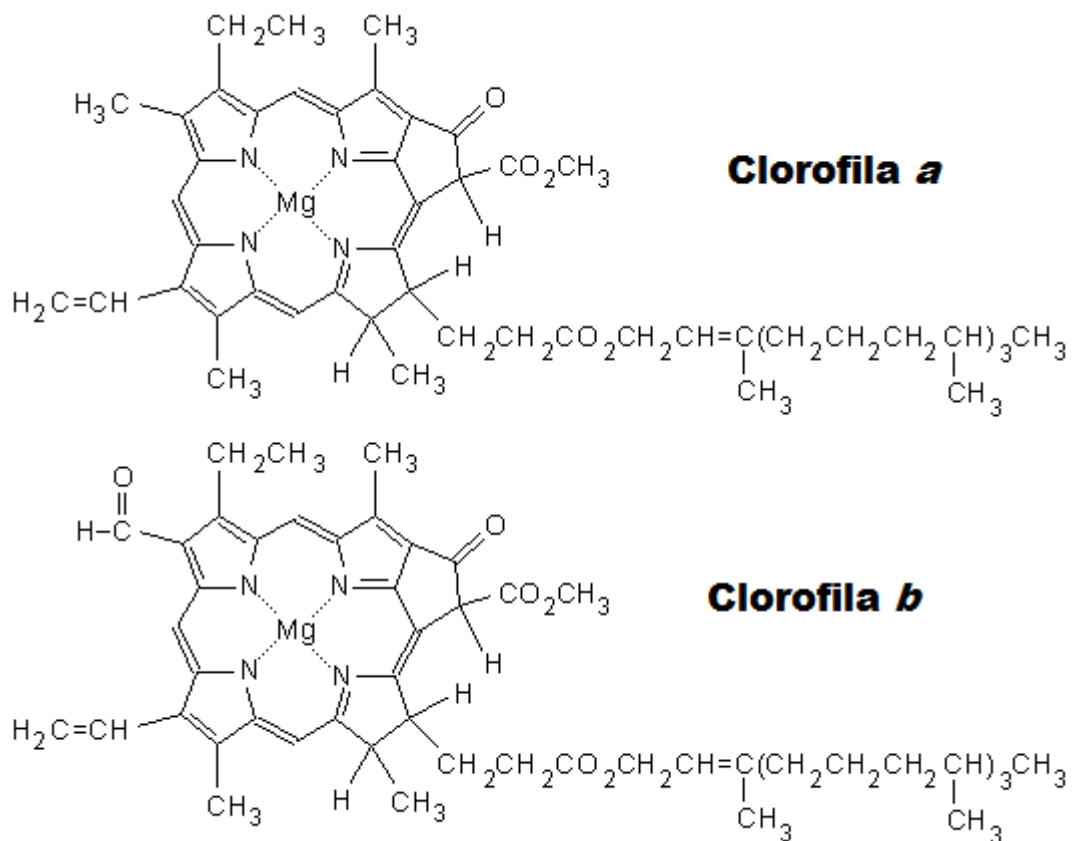


Figura 1.8: Estrutura química da clorofila (a e b). (Cienciasdosalimentos.wordpress.com)

1.6.7.2 Carotenóides

Os carotenóides, figura 1.9, são pigmentos orgânicos tetraterpenoides que ocorrem naturalmente em cloroplastos e cromoplastos de plantas e alguns outros organismos fotossintéticos, como as algas, bactérias e alguns fungos. Caracterizam-se por apresentar moléculas oxidáveis, exibir cores que vão do amarelo ao vermelho, são lipossolúveis e encontrados em vegetais. São essenciais como precursores da síntese da Vitamina A em animais e humanos. Os carotenóides conhecidos são divididos em dois grupos: carotenos e xantofilas. Os carotenos são pigmentos alaranjados, que dão cor à cenoura, por exemplo; são puramente hidrocarbonetos e não contêm oxigênio. Já as xantofilas podem variar de amarelo a castanho-avermelhado e contêm oxigênio na sua estrutura (Fontana et al., 2000).

Os carotenóides apresentam grande importância para a fotossíntese. Estas moléculas são responsáveis pela proteção da clorofila do excesso da luz e ainda são de grande importância para a alimentação humana, sendo os carotenóides β -

caroteno, α -caroteno, γ -caroteno e β -criptoxantina os precursores da vitamina A. Esta, entre outras funções, atua diretamente na respiração celular e sintetiza pigmentos da retina. Alguns carotenóides por exemplo, normalmente apresentam ainda ação como antioxidantes (Moyano et al., 2010).

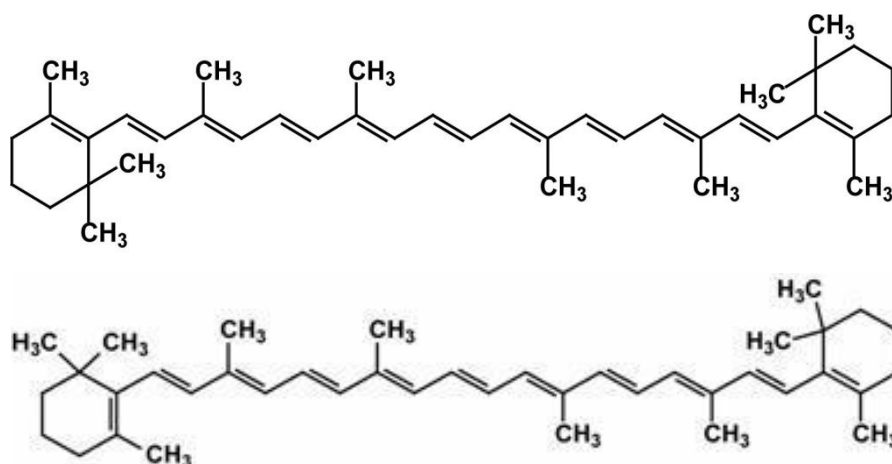


Figura 1.9: Estruturas químicas: β -caroteno (acima) e α -caroteno (abaixo) (Frickel, 1984).

1.6.7.3 Presença no azeite

O controlo qualitativo e quantitativo dos pigmentos presentes nas azeitonas e nos azeites extraídos tem proporcionado um maior conhecimento da influencia desses compostos nas áreas da maturação, tempo de armazenagem na industria e no processo de extração do azeite e o que se tem reportado é uma relação direta do tempo de colheita com a concentração destes compostos. Daí se conclui que quanto mais longa a colheita maior será o decréscimo desses compostos, sendo ainda que durante a armazenagem ocorre um aumento da concentração de ácidos, favorecendo também um decréscimo considerável dos pigmento. As perdas são principalmente de clorofilas, que sofrem mudanças estruturais causadas pela libertação de ácidos. Ocorre nomeadamente a transformação de clorofilas em feofitinas pela remoção de iões Mg^{2+} (Giuffrida et al., 2007).

Durante o amadurecimento e pós colheita dos frutos, a degradação celular, acompanhada pela oxidação de ácidos gordos insaturados que fazem parte do

componente lipídico das membranas (reação catalisada por lipoxigenases) permite a libertação de material celular rico em enzimas. Os compostos de cor agora em contato com este material celular, podem oxidar-se facilmente, sendo esta reação favorecida quando submetidos a alguns factores extrínsecos como o excesso de luz e abundância de oxigénio e em presença de lipoxigenases naturais, causando assim mudanças na cor original do azeite de verde para tons de castanho (Giuffrida et al., 2007; Moyano et al., 2010).

O radical livre formado pela ação da lipoxigenase em ácidos gordos insaturados com cis-cis-1,4 pentadieno apresenta um papel crucial nesta reação (figura 1.10) (Minguez-Mosquera et al., 1990).

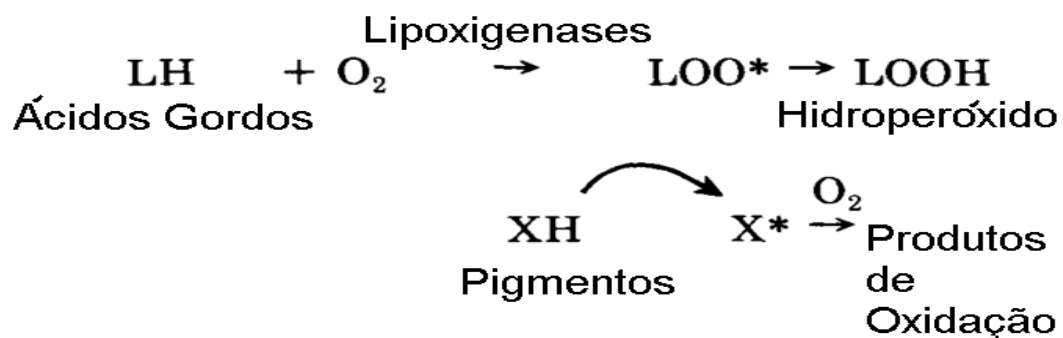


Figura 1.10: Esquema de reação para a degradação de pigmentos pela ação enzimática (Minguez-Mosquera et al, 1990)

1.6.7.4 - Evolução de Cor

O objetivo das medições de cor nos alimentos está baseada na tendência de aceitabilidade do produto pelo consumidor final, o que levou ao desenvolvimento de técnicas e equipamentos simples para este propósito. Houve ainda um aumento na tendência de relacionar as coordenadas de cor com o nível de pigmentos presentes. Estes equipamentos apresentam uma serie de vantagens que vão da portabilidade e rapidez até à facilidade de automação em linhas de produção (Moyano et al., 2008).

Segundo alguns autores a concentração dos compostos de cor nos azeites varia muito de uma variedade para outra, sendo também afetados pelo estagio de maturação e época de colheita, (Moyano et al., 2010). A metodologia mais utilizada

para esta determinação da evolução de cor são as ordenadas L^* , a^* e b^* do espectro de absorção. Porém utilizando espectrofotometria pode-se também calcular a concentração desses pigmentos (Isabel, Gandul-Rojas, Sanchez, & Garrido-Fernandez, 1991). Ainda segundo estes autores boas correlações são estabelecidas entre a ordenada b^* e o teor de carotenóides no azeite.

2 Objetivos

O objetivo deste trabalho é o de avaliar a qualidade físico-química e de atividade biológica de azeites produzidos na região do Algarve, nas produções de 2009, 2010 e 2011, representando amostras monovarietais e de mistura. Estes azeites foram recolhidos de lagares privados e públicos, sendo essencial o seu estudo e caracterização para traçar um perfil do produto da região.

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais

Foram realizadas as análises em 19 amostras de azeites Algarvios referentes às safras de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012. As amostras eram procedentes de lagares da região, armazenadas imediatamente em frigorífico, sendo 6 amostras monovarietais (Picual, Maçanilha e Cobrançosa), 3 da safra de 2009/2010 e 3 da safra 2010/2011. As demais amostras eram multivarietais de lagares públicos. Para maior fiabilidade dos resultados, todas as análises foram realizadas em triplicado.

As amostras foram identificadas utilizando um conjunto de letras e números relacionados com lagar, a variedade e o ano de safra, como pode ser observado na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Identificação das amostras de azeite

Amostra	Ano	Código
Almodôvar	2009	Al09
Cobrançosa	2009	Co09
Cobrançosa	2010	Co10
Maçanilha	2009	Ma09
Maçanilha	2010	Ma10
Monchique	2009	Mo09
Monchique	2010	Mo10
Olicer 0,7	2011	O117
Olicer 1	2011	O111
Pecoliva 0,8-0,9	2011	P118
Pecoliva0,6	2011	P116
Picual	2009	Pi09
Picual	2010	Pi10
São Brás 0,6	2010	P106
São Brás 1	2009	P090
São Brás	2010	P101
Tavira 0,6	2010	O106
Tavira 1,3	2009	O090
Tavira	2010	O101

3.2 Acidez (método titulimétrico)

O índice de acidez foi determinado de acordo com Regulamento EU N° 61/2011 da Comissão Europeia. Uma quantidade em massa de 20 g de azeite foi pesada para um erlenmeyer de 250 mL, adicionando 100 mL de mistura dissolvente (essa solução foi agitada manualmente) e 3 gotas de fenolftaleína. Procedeu-se à titulação com NaOH 0,1N e o Índice de Acidez foi calculado de acordo com a equação 1 abaixo.

$$IA = \frac{V \times C \times M}{m} \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

V = Volume gasto na titulação (mL)

C = Concentração de NaOH gasto (mol/L)

M = Massa de NaOH (g)

m = Massa de Amostra (g)

Equação 1: Cálculo do índice de acidez

3.3 Índice de Peróxidos

O índice de Peróxidos foi determinado de acordo com Regulamento EU N° 61/2011 da Comissão Europeia. Foi pesada rigorosamente uma massa entre 0,8 g e 1,2 g de cada amostra de azeite para um erlenmeyer com tampa de vidro. Essa massa foi então dissolvida em 10 mL de clorofórmio, 15 mL de ácido acético glacial e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio, agitando manualmente por 1 minuto e em seguida levada a repouso no escuro por 5 minutos. Decorrido esse tempo foram adicionados 75 mL de água destilada e 3 gotas de cozimento de amido, como indicador. Titulou-se em seguida com uma solução de tiosulfato

de sódio 0,01N, anotaram-se os resultados e o índice de peróxidos foi calculado utilizando a equação 2 a seguir:

$$IP = \frac{10xV}{m} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

V = Volume de tiosulfato de sódio 0,01N gasto na titulação (mL)

m = Massa da amostra de azeite em (g).

Equação 2: Calculo do Índice de Peróxidos.

3.4 Absorvência no ultravioleta

Este procedimento foi realizado de acordo com Regulamento EU N° 61/2011 da Comissão Europeia, para ensaios de absorvência no ultravioleta. Uma massa de 0,25 g de azeite foi pesada em um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi aferido com iso-octano. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda $\lambda = 232 \text{ nm}$ e $\lambda = 270 \text{ nm}$ para determinar os coeficientes K e as leituras nos comprimentos de onda $\lambda = 266$ e $\lambda = 274$ para calcular a variação de absorvência ΔK . Os valores foram calculados de acordo com a equação 3 abaixo:

$$K_{232} = \frac{Abs\ 232}{(CxS)} \quad K_{270} = \frac{Abs\ 270}{(CxS)} \quad \Delta K = \frac{K_{270}}{(K_{266} + K_{274})/2} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

K_{232} = Extinção específica a $\lambda = 232 \text{ nm}$

K_{270} = Extinção específica a $\lambda = 270 \text{ nm}$

ΔK = Extinção específica no comprimento de onda para a máxima absorção em torno de $\lambda = 270 \text{ nm}$

Abs. = absorvência medida para o comprimento de onda correspondente

D = Concentração da solução (g/mL)

S = Percurso ótico (cm)

Equação 3: Cálculo de ΔK_{272} , ΔK_{270} e ΔK

3.5 Estabilidade à Oxidação

A determinação da estabilidade oxidativa foi medida de acordo com o método proposto pela Sociedade Americana de Química do Óleo (AOCS Cd12 b-92) para Rancimat. Este método baseia-se na formação de compostos mais polares do que os triglicerídeos do óleo durante o aquecimento e consequente oxidação. Estes compostos são arrastados pelo fluxo de ar para um tubo coletor com água onde um eletrodo mede a variação de condutividade da solução (figura 3.1).

Foi pesada uma massa de 3 g de amostra no recipiente reator (2), o recipiente foi colocado num dos vasos de aquecimento do equipamento (3), procedeu-se a montagem das outras peças para o funcionamento normal, foi medido um volume de 60 mL água mili-Q e transferido para o vaso coletor de vapores (5). Para finalizar a montagem, os eletrodos (4), de sensibilidade conhecida, foram acoplados a estes tubos e os valores das constantes de calibração foram estipuladas no programa do aparelho (6).

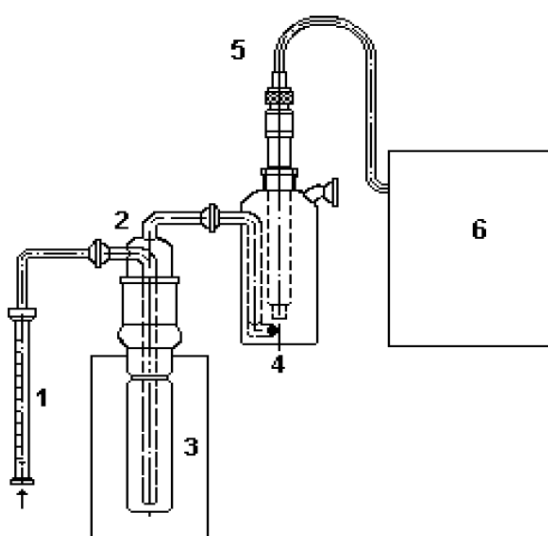


Figura: 3.1: Esquema de montagem do aparelho Rancimat

O fluxo de ar (1) foi ajustado para 20 L/h e foi necessário um tempo de espera de 20 minutos para estabilização desse fluxo, a condutividade foi ajustada para 100 μ S/cm e as temperaturas de ensaio foram 140°, 130°, 120° e 110°C sendo a variação de temperatura 3,7°, 3,6°, 3,4° e 3,3° C respectivamente. Após ter sido atingido o período de estabilização, foram anotados os tempos de indução calculados pelo equipamento.

A limpeza do equipamento foi realizada de forma a evitar resíduos nos vasos reatores e nos elétrodos.

3.6 Determinação da atividade antioxidante: preparação da amostra

Preparação da amostra:

A preparação das amostras foi realizada de acordo com uma variação do método proposto por Murkovic et al., (2004). Os compostos polifenólicos foram extraídos pesando uma massa de 3 g de azeite para um tubo de centrifuga e adicionando 3 mL de solução 80 % metanol em água (v/v). Essa mistura foi submetida a um minuto de agitação vigorosa em vortex e para finalizar e favorecer a separação das fases, os tubos foram levados para centrifugação a 13500 rpm por 5 minutos.

A fase metanólica foi então removida e reservada, enquanto a fase lipídica foi descartada. Esse procedimento foi realizado 3 vezes para cada amostra. O extrato metanólico obtido foi utilizado para as determinações do teor em compostos fenólicos totais, flavonóides totais, antioxidantes totais (TOA), antioxidantes totais pelo método DPPH e perfil dos compostos fenólicos, utilizando cromatografia líquida.

3.7 Determinação colorimétrica do teor em compostos fenólicos totais

A determinação do teor em compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método descrito por Gutfinger et al., (1981). Foi medido 1 mL do extrato metanólico para um balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionados 3 mL de água Mili-Q e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, tendo a mistura sido deixada em

repouso por 3 minutos. Então foram adicionados 1 mL de solução de Na₂CO₃ 7,5% (v/v). Depois de 5 minutos, essa mistura foi agitada e então o volume foi aferido para 10 mL e armazenada ao abrigo da luz por um período de uma hora. Após este tempo a leitura foi realizada usando um espectrofotômetro Hitachi U-2000 de duplo feixe UV-Vis (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) a um comprimento de onda $\lambda=725$ nm. A curva de calibração foi construída utilizando soluções padrões de ácido cafeico de concentração na faixa de 0-10 mg/L e os resultados calculados e expressos em mg de ácido cafeico por kg de azeite.

3.8 Determinação do perfil dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida

A determinação do perfil de compostos fenólicos foi realizada utilizando o equipamento de cromatografia líquida HPLC Jasco PU 2080 Plus, equipado com detetor de array de diodos Jasco MD2015. Os eluentes A e B: eluente A água-metanol-ácido acético a 93:5:2, v/v/v e eluente B metanol-ácido acético, 98/2 v/v. Foi ainda utilizada uma coluna de fase reversa Agilent C18 e o programa do fluxo dos eluentes foi estipulado de acordo com os seguintes gradientes: de 0 a 5 minutos 100% A: 0%B, de 5 a 50 minutos 60% A:40% B, de 50 a 60 minutos 40% A:60% B, de 60 a 65 minutos 25% A:75% B, 65 a 70 minutos 0% A:100% B, de 70 a 80 minutos 100% A:0% B. O fluxo foi de 0,6 mL por minuto. Os cromatogramas obtidos foram analisados e comparados de acordo com os tempos de retenção obtidos com as injeções de padrões. A concentração dos compostos fenólicos foi calculada por recurso às equações das retas obtidas experimentalmente para cada padrão.

3.9 Determinação do teor de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides totais foi realizada de acordo com o método proposto por Huang et al., (2005). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato metanólico foi medida para um tubo de ensaio e foi adicionado 1,0 mL de cloreto de alumínio 2% em metanol. Essa solução foi transferida para um local ao abrigo da luz e o tempo de reação foi de 10 minutos. Após o tempo de reação a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda $\lambda=430$ nm. A reta de

calibração foi construída com soluções padrão de Quercetina com concentrações na faixa de 0-0,1 mg/mL, procedendo-se da mesma forma que para a amostra. Os resultados foram calculados e expressos em mg de quercetina por kg de azeite.

3.10 Determinação do teor em antioxidantes totais (TOA)

A determinação do teor em antioxidantes totais foi realizada de acordo com o método por Ganesan et al, (2008). Foi medida para os tubos de ensaio uma alíquota de 0,3 mL de cada extrato metanólico, sendo adicionados em seguida 3 mL da solução reagente (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM fosfacto de sódio e 4 mM molibdato de amónio). Um branco foi preparado da mesma forma que as amostras, utilizando solvente no lugar do extrato. Os tubos de ensaio foram incubados em banho de água a 95 °C durante 90 minutos.

Soluções padrão de ácido ascórbico de concentração entre 0-0,1 mg/mL foram preparadas da mesma maneira que os extratos metanólicos, de modo a serem usadas para construir a reta de calibração.

Foi realizada a leitura da absorvância no comprimento de onda $\lambda=695$ nm e os resultados calculados e expressos em mg de ácido ascórbico por kg de azeite.

3.11 Determinação do teor de antioxidantes totais pelo método do DPPH

Foram preparadas 5 diluições a partir da solução de extrato metanólico e então medidos 0,1 mL de cada diluição para um tubo de ensaio e adicionado 3,9 mL do radical DPPH 0,06 mM (previamente diluído em metanol). Os tubos foram homogeneizados energicamente em vortex (Heidolph relax top, JP, Selecta, Barcelona). Uma solução branco foi preparada usando 0,1 mL de uma solução 80% metanol em água. As amostras foram levadas para reação no escuro por 60 minutos. A leitura em espectrofotómetro foi realizada no comprimento de onda $\lambda=515$ nm, sendo calculado o IC₅₀ a partir da equação da reta obtida.

3.12 Evolução de Cor

A cor foi avaliada em termos de valores L^* , a^* , b^* , com um colorímetro (Dr Lange Spectro-colour, Berlin, Germany) no sistema Hunter (HunterLab, 2000). O colorímetro foi calibrado contra um padrão de cerâmica branca ($X = 84.60$, $Y = 89.46$ and $Z = 93.85$). O sistema Lab Hunter é um sistema de coordenadas retangulares que define a cor em termos de luminosidade de preto *versus* branco (L^*), vermelho *versus* verde (a^*) e amarelo *versus* azul (b^*).

O parâmetro L^* indica a coordenada não cromática desde 0 (preto) até 100 (branco), a^* representa a coordenada horizontal que vai desde -80 (verde) até 80 (vermelha), b^* representa a coordenada horizontal que vai desde -80 (azul) até +80 (amarelo).

Por se tratar de um líquido, foi utilizado um recipiente de vidro especial fornecido junto com o equipamento. O volume foi preenchido até a marca no pequeno cilindro de vidro, o equipamento acoplado e acionado o botão para realizar a leitura.

Para o ensaio de clorofilas e carotenóides foi utilizada a metodologia proposta por Minguez-Mosquera et. al., (1991). Foi pesada uma alíquota de 7,5 g de amostra e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi aferido com ciclohexano. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda $\lambda=670$ nm para determinação de clorofilas e $\lambda=470$ nm para os carotenóides, sendo utilizados os coeficientes de extinção molar 613 e 2000 $M^{-1}cm^{-1}$ respectivamente para o cálculo da concentração destes compostos, tendo os resultados sido expressos em mg de pigmento/kg de azeite.

4 Resultados e Discussões

4.1 Acidez e Índice de Peróxidos

A acidez e o Índice de Peróxidos foram avaliados de acordo com Regulamento EU N^o 61/2011 da Comissão Europeia de Janeiro de 2011. Os valores obtidos encontram-se na tabela 4.1 em que os valores de acidez estão expressos em gramas de ácido oleico presentes em 100 gramas de azeite.

Tabela 4.1: Valores médios de Acidez e Índice de Peróxidos. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Acidez (g/100g azeite)	% Ac. Oleico	Índice de Peróxidos (Meq O ₂ /kg)
<i>Al09</i>	2,67 ± 0,12	1,34 ± 0,06	23,92 ± 1,63
<i>Co09</i>	0,67 ± 0,01	0,34 ± 0,00	16,30 ± 0,25
<i>Co10</i>	0,56 ± 0,01	0,28 ± 0,00	10,68 ± 0,42
<i>Ma09</i>	0,70 ± 0,01	0,35 ± 0,00	11,36 ± 2,05
<i>Ma10</i>	0,67 ± 0,01	0,34 ± 0,00	15,28 ± 0,83
<i>Mo09</i>	3,23 ± 0,03	1,62 ± 0,01	18,72 ± 2,14
<i>Mo10</i>	2,69 ± 0,01	1,35 ± 0,01	28,12 ± 0,86
<i>O090</i>	0,82 ± 0,03	0,41 ± 0,02	15,77 ± 0,34
<i>O101</i>	2,70 ± 0,02	1,35 ± 0,01	24,70 ± 1,03
<i>O106</i>	2,35 ± 0,01	1,18 ± 0,01	25,85 ± 0,86
<i>O111</i>	2,94 ± 0,02	1,48 ± 0,01	36,20 ± 1,00
<i>O117</i>	1,54 ± 0,06	0,78 ± 0,03	36,47 ± 7,2
<i>P090</i>	1,37 ± 0,03	0,69 ± 0,01	30,62 ± 0,73
<i>P101</i>	2,35 ± 0,03	1,18 ± 0,01	35,60 ± 1,78
<i>P106</i>	2,20 ± 0,01	1,10 ± 0,01	37,09 ± 1,71
<i>P116</i>	1,74 ± 0,03	0,87 ± 0,01	26,61 ± 1,86
<i>P118</i>	2,05 ± 0,06	1,03 ± 0,03	29,39 ± 0,84
<i>Pi09</i>	0,68 ± 0,01	0,34 ± 0,01	7,86 ± 0,66
<i>Pi10</i>	0,63 ± 0,06	0,32 ± 0,03	9,16 ± 0,07

Todas as amostras apresentam valores de acidez dentro dos valores especificados na legislação Europeia (N^o 61/2011), sendo que as amostras monovarietais predominaem entre aquelas com valores para a classificação “extra virgem”, pois todas as amostras apresentam valores de acidez ≤0,8 % de ácido

oleico sendo que as amostras do Lagar Olicer 2009 e 2011 com 0,7^o de ácido oleico e Pecoliva 2009 também apresentaram valores inferiores a este índice.

Todas as demais amostras apresentaram valores de acidez expressos em percentagem de ácido oleico superiores a 0,8% Porém inferiores a 2% de ácido oleico, valores estes que possibilitam a classificação dos mesmos como “azeites virgens”.

Estes valores podem estar relacionados com o método e a finalidade dos azeites extraídos. Enquanto que os monovarietais (provenientes de Moncarrapacho) são extraídos de forma comercial com procedimento padronizado e controlado, visando obter azeites de boa qualidade e valor agregado alto para venda, os azeites dos demais lagares (públicos), são extraídos de forma artesanal e cada pequeno agricultor pode trazer uma variedade de azeitona e em diferentes estágios de maturação. O processo não visa obter produtos comerciais de valor agregado alto e dessa forma não se obtêm azeites com características uniformes. Uma parte desse azeite fica para o lagar como forma de pagamento e dessa forma ocorre uma grande mistura nos toneis de armazenamento.

A falta de controlo do índice de maturação das azeitonas também pode explicar o grau de acidez mais elevado, pois durante o processo de maturação há um aumento progressivo da atividade de enzimas lipolíticas. Desde modo, pode-se inferir a falta de conhecimento por parte dos pequenos agricultores quanto ao momento da colheita, resultando portanto em azeites de elevada acidez (NP 903, 1987).

No tocante ao índice de peróxidos, o mesmo comportamento das amostras foi observado, Porém as amostras monovarietais do lagar de Moncarrapacho ano 2009 (Picual, Mançanilha e Cobrançosa) e Olicer 2009 foram as únicas a apresentar valores dentro do padrão estipulado pela legislação (valores em meq de O₂ ≤20), os demais azeites analisados apresentaram valores acima de 20 meq (C. Europeia, 2011).

Os valores observados podem indicar falhas no método de extração, uma vez que valores de acidez elevados estão relacionados com estado de maturação avançado dos frutos, falta de condições ou período de armazenamento

inadequadas, falta de controlo da temperatura durante a batidura, o que pode ter favorecido o processo de degradação enzimática e conseqüente oxidação dos compostos presentes naturalmente na azeitona. Segundo Ranalli et. al., (2003), um período prolongado de batidura provoca variações consideráveis na acidez, índice de peróxidos e ainda variações mais significantes na concentração de pigmentos, compostos fenólicos e voláteis (Ranalli et al., 2003).

Vale salientar que as amostras das safras 2009 e 2010 se encontravam armazenadas em frigorífico desde a época de colheita até ao momento das análises, enquanto que as amostras de 2011 foram prontamente analisadas, mas ainda assim apresentaram valores acima do especificado na legislação. Nenhuma amostra de azeite monovarietal da safra de 2011 foi analisado.

Não foram observadas diferenças nos valores obtidos entre as safras e os resultados obtidos não apresentavam tendências de aumento ou diminuição entre diferentes safras mesmo durante o período de armazenamento.

Os azeites do lagar Olicer apresentaram um aumento de acidez entre a safra de 2009 para a de 2011. O índice de peróxidos da safra 2009 foi o menor valor apresentado entre os azeites analisados provenientes deste lagar.

Um comportamento contrário foi observado para o Lagar Pecoliva, pois os azeites analisados das safras 2011 e 2010 apresentaram índices de peróxidos e grau de acidez menores que a safra 2009.

Os resultados das análises ao teor de acidez e peróxidos permite-nos dizer que há uma má informação dos agricultores em relação ao processo de extração de azeite, tornando-se necessária uma maior divulgação dos conceitos de qualidade e eficiência de produção aos pequenos agricultores. Esta ação poderia favorecer o desenvolvimento dos lagares da região, bem com estimular a produção local para produtos de melhor qualidade e com maior rendimento.

4.2 Absorvência no Ultravioleta

Os valores de K_{232} , K_{270} e ΔK foram calculados de acordo com Regulamento EU N° 61/2011 da Comissão Européia. Com os valores das absorvências obtidas

espectrofotometricamente podem-se calcular os valores destes coeficientes que se encontram na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores médios de K_{232} , K_{270} e ΔK . Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

	K_{232}		K_{274}		ΔK	
<i>Ai09</i>	1,948	± 0,024	0,161	± 0,003	0,002	± 0,001
<i>Co09</i>	1,040	± 0,003	0,261	± 0,005	0,015	± 0,002
<i>Co10</i>	0,975	± 0,004	0,163	± 0,008	0,003	± 0,001
<i>Ma09</i>	1,020	± 0,02	0,140	± 0,005	0,004	± 0
<i>Ma10</i>	1,048	± 0,002	0,146	± 0,007	0,006	± 0,001
<i>Mo09</i>	2,193	± 0,028	0,130	± 0,006	0,003	± 0,001
<i>Mo10</i>	2,475	± 0,038	0,134	± 0	0,005	± 0,001
<i>O117</i>	1,484	± 0,013	0,141	± 0,002	-0,001	± 0,001
<i>O111</i>	1,554	± 0,011	0,158	± 0	0,005	± 0,003
<i>P118</i>	1,394	± 0,022	0,122	± 0,002	0,000	± 0,001
<i>P116</i>	1,470	± 0,007	0,131	± 0,001	0,002	± 0,002
<i>Pi09</i>	0,968	± 0,017	0,131	± 0,002	0,004	± 0,001
<i>Pi10</i>	1,022	± 0,01	0,133	± 0,001	-0,016	± 0,003
<i>P106</i>	2,108	± 0,026	0,140	± 0,001	-0,004	± 0,002
<i>P090</i>	2,127	± 0,017	0,139	± 0,002	0,000	± 0,002
<i>P101</i>	2,304	± 0,029	0,154	± 0,003	0,000	± 0,002
<i>O106</i>	0,154	± 0,002	0,119	± 0,003	-0,201	± 0,003
<i>O090</i>	0,150	± 0,002	0,116	± 0,003	-0,196	± 0,003
<i>O101</i>	2,155	± 0,007	0,160	± 0,002	0,003	± 0,001
<i>Leg. Azeite Extra virgem</i>	≤2,5		≤0,22		≤0,01	
<i>Leg. Azeite Virgem</i>	≤2,6		≤0,25		≤0,01	

Apesar de algumas amostras não apresentarem valores de índice de peróxidos dentro dos valores estipulados pela legislação Europeia N° 61/2011 (C. Europeia, 2011), todos os valores dos coeficientes K_{232} , K_{270} e ΔK estão de acordo com as normas legislativas (C. Europeia, 2011). Os valores ao final da tabela indicam os valores estipulados pela legislação vigente.

Apenas a amostra da variedade Cobrançosa da safra 2009 apresentou um valor de K_{270} levemente superior ao estipulado pela legislação, o que indica que houve uma libertação de produtos secundários de oxidação.

De um modo geral a análise dos resultados apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2 levam-nos a concluir que após o período de armazenagem refrigerada, todas as amostras de azeite apresentavam uma boa qualidade.

A combinação de análise dos resultados das tabelas 4.1 e 4.2, permite-nos afirmar que o método de armazenamento das amostras foi adequado e não houve degradação das mesmas durante o período de armazenagem.

Não foram observadas tendências de diminuição ou aumento dos índices ao longo dos diferentes anos de safra, pois cada conjunto de amostras apresentou valores distintos sem correlação direta ao ano de colheita, indicando assim que as variações dos compostos nas diferentes safras se justificam pelos diferentes métodos de colheita, tempo de maturação e extração, bem como combinação de variedades de azeitona utilizadas na produção do azeite.

Para avaliar a interrelação entre os parâmetros estudados, vários modelos foram aplicados aos resultados obtidos utilizando o programa SPSS statistics 16, como auxílio para compreender a dependência dos factores bem como a significancia dos modelos adotados. Numa primeira fase, foram selecionados parâmetros correlacionados e entre eles todas as hipóteses foram testadas, seja em conjunto ou separados de modo a verificar os factores de maior influencia sobre as variáveis independentes escolhidas.

O modelo foi aplicado para a variável dependente K_{232} , obtendo-se os valores apresentados na tabela 4.3 a seguir. De acordo com a análise de regressão (tabela 4.3), pode-se verificar que este factor está correlacionado com os valores de índice de peróxidos e antioxidantes totais, com um grau de significância de 99% (0,004).

Tabela 4.3: ANOVA para a variável dependente K_{232}

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error
1	(Constant)	1,743	,543		3,213	,005
	Peróxidos	,039	,012	,559	3,175	,006
	TOA	-,004	,002	-,460	-2,612	,019

a Variável dependente: K_{232}

Esta análise também é conclusiva no tocante a ação destes, pois de acordo com a regressão linear pode-se confirmar que o índice de peróxidos tem um efeito positivo sobre o valor de K_{232} e o TOA tem um efeito negativo, ou seja, a concentração de antioxidantes no azeite favorece a diminuição da formação de compostos dienos conjugados, diminuindo assim o valor da absorção a 232 nm, enquanto o índice de peróxidos aumenta este mesmo valor, o que condiz com o esperado.

4.3 Estudo da Cor e Compostos de Cor

4.3.1 Parametros de Cor CIELAB L^* , a^* , e b^*

Para este trabalho foi realizada a determinação das coordenadas de cor parâmetro L^* , que indica a coordenada não cromática desde 0 (preto) até 100 (branco), a^* que representa a coordenada horizontal que vai desde -80 (verde) até 80 (vermelha) e b^* que representa a coordenada horizontal que vai desde -80 (azul) até +80 (amarelo) (Moyano et al., 2008).

Os azeites da região Algarvia são muito procurados para corrigirem a cor de azeites mais claros, produzidos na região norte do país. Devido aos índices solares da região Algarvia, as plantas produzem uma maior concentração de compostos de proteção, os quais normalmente são compostos de cor (clorofilas e carotenos) sintetizados pelas plantas em situação de stress luminoso e servem como proteção

da radiação ultravioleta para as componentes essenciais as células das plantas, principalmente o DNA (que sofre mutações em presença de radiação UV).

Observando a tabela 4.4 pode-se verificar que os valores de L* das amostras analisadas, como era de se esperar, apresentaram valores que variam de 29,81 a 37,97. Dentro da escala de cor estes resultados indicam azeites de coloração mais escura.

Tabela 4.4: Parametros de Cor CIELAB L*, a*, e b*. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	L*	a*	b*
Al09	30,22 ±0,45	-1,25 ±0,06	8,94 ±0,63
Co09	34,72 ±0,17	-1,80 ±0,19	5,78 ±0,22
Co10	36,87 ±0,19	-1,95 ±0,05	4,67 ±0,25
Ma09	36,97 ±0,28	-2,49 ±0,07	7,68 ±0,11
Ma10	37,97 ±0,29	-2,94 ±0,03	9,00 ±0,02
MO09	31,23 ±0,09	-1,33 ±0,14	8,13 ±0,17
MO10	32,40 ±0,21	-1,52 ±0,05	6,19 ±0,28
O090	30,99 ±0,36	-1,08 ±0,08	9,26 ±0,52
O101	30,95 ±0,16	-1,50 ±0,05	8,05 ±0,55
O106	30,40 ±0,13	-1,46 ±0,11	8,14 ±0,29
O111	35,01 ±0,02	-2,88 ±0,05	10,96 ±0,03
O117	36,06 ±0,11	-3,10 ±0,03	11,60 ±0,18
P090	30,07 ±0,26	-1,01 ±0,17	8,56 ±0,58
P101	30,01 ±0,15	-1,31 ±0,19	8,06 ±0,41
P106	29,81 ±0,51	-1,22 ±0,05	7,99 ±0,47
P116	34,85 ±0,05	-2,61 ±0,09	11,36 ±0,19
P118	34,79 ±0,04	-2,66 ±0,10	11,69 ±0,20
Pi09	36,77 ±0,06	-3,00 ±0,11	11,06 ±0,11
Pi10	36,51 ±0,69	-2,91 ±0,14	13,03 ±1,31

Com relação à coordenada a* os valores obtidos variaram entre -3,10 até -1,0 (tabela 4.4). Estes valores indicam que os produtos se encontram dentro da faixa do verde, enquanto que a coordenada b* apresentou valores positivos entre 4,67 e 13,03, ou seja, na faixa no amarelo, valores estes coerentes com a coloração verde-amarelada apresentada pelos azeites analisados.

Esta composição de coordenadas encontra-se de acordo com o esperado,

visto que os azeites do Algarve possuem uma coloração escura que varia entre o amarelo e o verde.

4.3.2 Clorofilas e Carotenóides

A quantificação de clorofilas e carotenóides foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico sugerido por Minguez-Mosquera et al., (1991). Os valores da Tabela 4.5 foram calculados utilizando a lei de Lambert e Beer, de acordo com a equação $A = c \times b \times \epsilon$, onde A é o valor de absorvência lido no espectrofotómetro, c a concentração a ser calculada, b o percurso ótico e ϵ o coeficiente de extinção molar. A concentração foi então calculada em mg de clorofilas ou carotenóides por kg de azeite.

Tabela 4.5: Concentração média de Clorofilas e Carotenóides. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Clorofilas (mg/kg)	Carotenóides (mg/kg)
Al09	9,66 ±0,21	4,51 ±0,07
Co09	1,54 ±0,06	0,85 ±0,03
Co10	2,06 ±0,01	1,15 ±0,00
Ma09	2,47 ±0,67	1,06 ±0,25
Ma10	2,15 ±0,01	1,01 ±0,00
Mo09	3,30 ±0,49	1,76 ±0,14
Mo10	3,25 ±0,19	1,79 ±0,22
O090	3,88 ±0,08	2,07 ±0,04
O101	5,22 ±0,05	2,19 ±0,02
O106	8,60 ±0,44	3,23 ±0,14
O111	5,69 ±0,20	2,37 ±0,06
O117	8,66 ±0,33	4,26 ±0,13
P090	5,65 ±0,07	2,24 ±0,03
P101	5,37 ±0,28	2,13 ±0,13
P106	4,81 ±0,32	1,77 ±0,13
P116	5,13 ±0,26	2,49 ±0,20
P118	4,81 ±0,08	2,30 ±0,05
Pi09	2,42 ±0,79	1,41 ±0,23
Pi10	2,73 ±0,01	1,93 ±0,01

A análise dos pigmentos de cor, clorofilas totais e carotenóides (tabela 4.5), permitiu um maior esclarecimento sobre o teor de compostos de cor presentes nas diferentes amostras de azeite, bem como a sua relação com a intensidade de cor, o qual se encontra mais desenvolvido a seguir.

A amostra que apresentou um maior teor de clorofilas totais e carotenóides totais foi a proveniente de um produtor de Almodovar da safra 2009 (Al09), com valores de 9,66 mg/kg e 4,51 mg/kg respectivamente. A amostra que apresentou os menores valores foi a monovarietal Cobrançosa 2009 (Co09) com teores de 1,54 mg/kg de clorofilas e 0,85 mg/kg de carotenóides. Verificou-se ainda uma tendência de menores concentrações destes pigmentos para as amostras de azeites monovarietais, sendo que todas as amostras apresentaram valores de concentração de clorofilas totais inferiores que 3,0 mg/kg e valores de concentração de carotenóides totais inferiores a 2,0 mg/kg.

De entre as amostras de misturas, a amostra de Monchique apresentou os menores teores de clorofilas totais, 3,30 mg/kg para a safra de 2009 (Mo09) e 3,25 mg/kg para a safra de 2010 (Mo10). De recordar aqui que a região de Monchique é uma região montanhosa e conseqüentemente de temperaturas inferiores às demais regiões do Algarve.

De forma geral as amostras provenientes dos lagares públicos Olicer e Pecoliva (mistura de variedades) apresentaram altos teores de ambos os compostos.

Segundo Matos et al., (2007) o teor de pigmentos de cor decresce com o índice de maturação dos frutos. Os valores iniciais de clorofilas totais apresentados por ele são em média de 25 mg/kg a 30 mg/kg iniciais até 2 mg/kg a 5 mg/kg em estágios mais avançados. O baixo teor de compostos de cor condiz com o resultado obtido para a acidez, no qual se evidencia um estágio de maturação elevado, devido ao alto valor de acidez apresentado pelas amostras, podendo-se inferir portanto que as azeitonas foram colhidas num estágio já avançado de maturação.

Estes resultados veem a confirmar a necessidade da implementação de um programa para maior esclarecimento junto dos produtores locais, em termos de

metodologias de plantação e colheita, bem como pós-colheita e produção, ajudando deste modo a aumentar a produtividade e a qualidade dos produtos locais.

Análise Estatística

De acordo com o resultado obtido para regressão linear (tabela 4.6) verifica-se que a variável independente Clorofila apresenta uma relação linear com os parâmetros de cor L* (variação entre uma coloração mais escura e uma coloração mais clara) e a* (variação de valores negativos de a* correspondem a cores mais verdes e positivos de a* correspondente a cores mais vermelhas) com significância de 0,006, mas não possui relação significativa com o parâmetro b* (variação entre coloração azul e amarelo para valores negativos a positivos de b*).

Tabela 4.6: ANOVA para a variável dependente Clorofilas

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error
1	(Constant)	39,078	8,142		4,799	,000
	L	-1,247	,302	-1,544	-4,124	,001
	a	-3,641	1,159	-1,177	-3,142	,006

a Variável dependente: teor de clorofilas

Por outro lado, verificou-se que para a concentração de carotenóides (tabela 4.7) as coordenadas L* e b* estão correlacionadas significativamente a 0,02 ou seja 98%, segundo a análise ANOVA. Esta análise está de acordo com os resultados obtidos por Moyano et al. (2008), no qual uma correlação similar foi identificada num estudo onde a coordenada b* apresentava melhor ajuste quando relacionada com a concentração de carotenóides dos azeites analisados.

Tabela 4.7: ANOVA para a variável dependente carotenóides

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error
1	(Constant)	5,727	2,235		2,562	,021
	L	-,170	,069	-,502	-2,477	,025
	b	,234	,091	,520	2,565	,021

a Variável dependente: Teor de carotenóides

4.4 Antioxidantes Totais

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, sendo a maior componente proveniente da dieta alimentar. Dentre eles encontram-se os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis e carotenóides, entre outros. A vitamina C tem muitas funções fisiológicas, entre elas, o elevado poder antioxidante e de reciclar a vitamina E, sendo que estas duas vitaminas em conjunto, apresentam um efeito sinérgico na proteção antioxidante (Sousa et al., 2007).

A análise do poder antioxidante total, portanto, é de muita utilidade, seja no tocante à conservação do produto em si, aumentando dessa forma o seu tempo de vida útil, bem como agrega um elevado valor nutricional ao produto, beneficiando a saúde dos consumidores e evitando inúmeras doenças.

Azeites extra-virgem são ricos em compostos fenólicos. Os flavonóides e os ácidos fenólicos fazem parte do grupo de polifenóis mais importantes para a nutrição humana (Ryan & Robards, 1998).

Na análise do teor de antioxidantes totais, busca-se elucidar o poder antioxidante do produto analisado, sendo o seu teor expresso em mg de ácido ascórbico por kg de azeite.

No respeitante aos azeites monovarietais, verifica-se que os da variedade Cobrançosa apresentavam, em 2009 (Co09) um valor de 289,42 mg/kg e em 2010 (Co10) de 201,42 mg/kg, enquanto que para os da variedade Maçanilha se

obtiveram valores de 243,38 mg/kg (Ma09) e 253,37 mg/kg (Ma10). Estes valores foram respectivamente semelhantes ou inferiores aos observados para a variedade Picual, com 340,79 mg/kg (Pi09) e 312,27 mg/kg (Pi10) (tabela 4.8).

Tabela 4.8: Atividade Antioxidante Total expressa em mg de ácido ascorbico presentes por kg de azeite. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Atividade (mg/kg)
<i>A109</i>	220,54 ±5,15
<i>Co09</i>	289,42 ±15,02
<i>Co10</i>	201,42 ±10,56
<i>Ma09</i>	243,38 ±13,40
<i>Ma10</i>	253,37 ±12,65
<i>Mo09</i>	214,36 ±3,81
<i>Mo10</i>	205,38 ±16,41
<i>O090</i>	525,01 ±9,28
<i>O101</i>	247,82 ±23,94
<i>O106</i>	265,76 ±27,74
<i>O111</i>	300,31 ±6,45
<i>O117</i>	320,67 ±17,07
<i>P090</i>	298,02 ±13,60
<i>P101</i>	307,30 ±33,78
<i>P106</i>	282,13 ±10,05
<i>P116</i>	390,24 ±24,51
<i>P118</i>	383,93 ±33,93
<i>Pi09</i>	340,79 ±18,43
<i>Pi10</i>	312,27 ±22,90

4.5 Flavonóides Totais

O grupo químico dos flavonóides é extenso, sendo subdividido em 7 classes. Possui atividades benéficas a saúde, destacando-se a prevenção de doenças degenerativas devido à sua capacidade anti-oxidante. Segundo Vinha et al., (2005), flavonóides livres aparecem no final do estágio de maturação como uma consequência do processo hidrolítico.

A tabela 4.9 mostra-nos os resultados obtidos para a concentração de flavonóides totais presentes por kg de azeite expressos em mg de Quercetina.

Todos os azeites analisados apresentaram baixos teores de compostos flavonoides, com uma variação entre 2,29 mg/kg de azeite (Ma09) e 5,94 mg/kg (Olicer 09), comparados com o total de polifenóis encontrados no azeites, segundo Kotsiou et al., (2011) o teor de flavonóides em azeites ocorre em pequenas quantidades.

Tabela 4.9: Flavonóides totais expressos em mg de Quercetina presentes por kg de azeite. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Flavonóides mg/kg
Al09	2,43 ±0,34
Co09	5,92 ±2,09
Co10	3,44 ±0,16
Ma09	2,29 ±0,19
Ma10	2,40 ±0,08
Mo09	2,89 ±0,23
Mo10	2,74 ±0,31
O090	5,94 ±0,65
O101	3,39 ±0,27
O106	3,51 ±0,21
O111	2,63 ±0,53
O117	5,06 ±0,71
P090	3,58 ±0,17
P101	3,73 ±0,18
P106	4,00 ±0,07
P116	3,71 ±0,47
P118	3,57 ±0,88
Pi09	3,06 ±0,41
Pi10	3,77 ±0,12

Para esta análise não se verificou nenhuma tendência de comportamento entre as amostras monovarietais. Os valores encontram-se dentro da mesma ordem de grandeza e não houve aumento ou decréscimo considerável em relação aos diferentes anos de safra.

Ensaio realizados neste mesmo laboratório com azeites croatas apresentam teores de flavonóides entre 6,1mg/kg a 8,1mg/kg, valores próximos aos azeites algarvios, apesar de consideravelmente superiores (Crnko, 2012).

A amostra Cobrançosa ano 2009 (Co09) foi a que apresentou uma maior concentração destes compostos, com um valor de 5,92 mg/kg. A variedade Maçanilha do mesmo ano (Ma09) apresentou a menor concentração, 2,29 mg/kg . A amostra Picual apresentou valores intermédios.

Para as amostras multivarietais, as amostras das safras de 2009 provenientes de ambos os lagares apresentaram concentrações maiores do que as das safras de 2010 e de 2011. Segundo Luna & Aparicio (2002), os factores climáticos afetam a concentração do perfil de compostos do azeite. Podemos induzir então, que associado aos resultados das demais análises, as alterações da composição das amostras da colheita de 2009, como sendo um factor sazonal que pode ter provocado uma maior concentração de compostos.

4.6 Compostos Fenólicos

Segundo Nissiotis et al., (2002), o azeite virgem apresenta normalmente uma concentração de fenóis na faixa de 50 mg/kg a 1000 mg/kg, sendo que, como já citado, estas variações estão relacionadas com diversos factores de cultivo e extração, como a variedade da oliveira, região, estagio de maturação, etc.

As análises dos compostos fenólicos foram realizadas a partir da extração em solução metanólica. A identificação e quantificação dos compostos foi possível pela utilização da técnica de HPLC, assim como o teor total foi realizada por método espectrofotométrico.

Os resultados destas análises podem ser verificados nas tabelas que se encontram nos subitens 4.6.1 e 4.6.2. O foco deste ensaio é identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos azeites produzidos na região, de modo a poder ser o início de um processo para verificar se o azeite regional Algarvio possui alguma especificidade em relação aos produzidos nas demais regiões do país.

4.6.1 Determinação do teor em compostos fenólicos totais

Seguindo o método proposto por Gutfinger (1981), a concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por método espectrofotométrico, calculada por recurso a uma curva de calibração, utilizando como padrão o ácido cafeico. Os resultados apresentados na tabela 4.10 estão expressos em mg de ácido cafeico por kg de azeite

Tabela 4.10: Concentração de compostos fenólicos totais expressa em mg de ácido cafeico presentes por kg de azeite. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Compostos Fenólicos mg/kg
Al09	190,85 ±38,62
Co09	270,59 ±16,02
Co10	212,34 ±3,00
Ma09	231,28 ±4,33
Ma10	243,42 ±26,40
Mo09	202,12 ±39,33
Mo10	195,55 ±47,25
O090	516,75 ±11,64
O101	235,81 ±44,97
O106	254,13 ±12,02
O111	307,47 ±50,88
O117	320,10 ±39,86
P090	213,72 ±15,58
P101	377,24 ±30,82
P106	314,47 ±51,63
P116	389,29 ±33,51
P118	380,41 ±29,91
Pi09	325,17 ±13,10
Pi10	296,80 ±16,14

Diversos autores reportam estudos da quantidade total de compostos fenólicos em azeites de diversas regiões do Mediterrâneo (Tura et al., 2007; Benito et al., 2012). Pode-se verificar que a concentração destes compostos varia entre 50 mg a 900 mg de ácido cafeico por kg de azeite.

As amostras analisadas apresentaram valores entre 190,00 mg/kg e 516,75 mg/kg, com um valor médio de 288,29 mg/kg. Estes valores encontram-se dentro da média reportada em outras publicações. Segundo Tura et al., (2007) em seu estudo sobre azeites italianos verificou-se uma média de 233,3 mg/kg (variação entre 55,4 - 615,5 mg/kg) e Ryan & Robards (1998) citam uma média geral de 350 mg/kg para azeites virgens.

Dentre as amostras monovarietais, a variedade Picual apresentou o melhor resultado, sendo Pi09 com 325,17 mg/kg e Pi10 296,80 mg/kg. Estes valores estão abaixo daqueles encontrados por Luna & Aparicio (2002) em azeites espanhóis da mesma variedade, 483 mg/kg, mas ainda assim apresentam valores expressivos e dentro da média encontrada na literatura.

A amostra multivarietal O090 apresentou a maior concentração dentre todas as amostras, 516,75 mg/kg, valor este que contribui para a sua maior estabilidade à oxidação (observado nas análises de Rancimat, em 4.7).

A amostra de Almodovar teve a menor concentração, 190,85 mg/kg, vale salientar aqui que este produtor se encontra situado na região do Alentejo.

4.6.2 Perfil de Compostos Fenólicos

Dentre os polifenóis encontrados no azeite, destacam-se o ácido cafeíco, o ácido vanílico, p-coumarico, siringico e p-hidroxi benzóico, o 3-hidroxifenil etanol (tirosol) e o 3,4-dihidroxifenil-etanol (hidroxitirosol). Desde que foi constatado que o perfil de compostos fenólicos em azeites difere muito de uma região para outra, estes tornaram-se alvo de pesquisas (Gutfinger, 1981).

A pesquisa do perfil de compostos fenólicos correspondentes a uma região faz parte do processo para obter a certificação de registo de denominação de origem protegida (DOP). Os compostos fenólicos estão relacionados com a origem e história do azeite, pois cada variedade ou mistura apresenta características únicas. Segundo Vinha et al., (2005), de acordo com um estudo realizado com azeites portugueses de diferentes regiões, estes apresentam diferenças na composição do perfil de compostos fenólicos. A análise do perfil dos compostos fenólicos serve para provar a autenticidade do azeite proveniente de cada região.

Os ensaios realizados com os azeites algarvios foram efetuados de forma minuciosa dentro dos padrões estabelecidos num projeto vigente do laboratório, em conjunto com a Universidade de Huelva (Espanha) e o Instituto Politécnico de Beja (Alentejo). Os resultados obtidos foram calculados através de retas de calibração na qual foram injetados todos os padrões, ou seja, todos os fenóis identificados estão relacionados com padrões injetados de forma única, ou mesmo em conjunto, para verificar a influência da matriz, diminuindo dessa forma os erros na determinação dos valores dos tempos de retenção.

Os tempos de retenção relativos e o cálculo em relação ao tempo de retenção do ácido gálico, encontram-se na tabela 4.11. Com os tempos de retenção tabelados e as retas de calibração foi então possível identificar e calcular a concentração dos fenóis presentes nas amostras analisadas, valores estes presentes nas tabelas 4.12 e 4.13.

Tabela 4.11 Tempo de retenção relativos dos compostos fenólicos (em minutos). Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Composto	Tempo (minutos)	Ret. Relativa
Ácido Gálico	10.320	1
Ruteína	63.840	6,19
Luteolina	60.267	5,84
Ácido Cafeico	58.453	5,66
Hidroxitirosol	66.853	6,48
Oleuropeína	67.480	6,54
Ácido Ferulico	73.653	7,14

A análise do perfil de compostos fenólicos pode ser de grande valia para uma região, quando se espera obter uma certificação DOP. Entretanto, a influência de um factor só pode ser avaliada quando os demais factores se mantêm constantes, o que não ocorre com os azeites multivarietais. Isto fica muito claro quando observamos os perfis de compostos fenólicos apresentados por eles: as concentrações variam muito de uma amostra para outra, sendo impossível traçar um padrão entre elas.

Fenóis hidrofílicos totais e a forma oleosídica do 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) estão bem correlacionadas com a estabilidade oxidativa dos azeites virgens (Ryan & Robards, 1998). Segundo Vinha et al. (2005), azeites ricos em oleuropeína e hidroxitirosol apresentam maior resistência à oxidação, dois compostos que apresentam forte proteção contra auto-oxidação e termo-oxidação de azeites.

Tabela 4.12: Perfil dos compostos fenólicos das amostras analisadas em mg por kg de azeite. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Ácido Galico	Ácido Cafeico	Luteolina	Ruteína
AL09	5,06 ± 0,02	2,07 ± 0,37	17,17 ± 2,72	26,73 ± 1,44
Co09	5,17 ± 1,59	2,59 ± 0,70	20,51 ± 0,81	18,43 ± 1,76
Co10	5,23 ± 0,35	5,28 ± 0,23	24,52 ± 0,40	7,28 ± 1,38
Ma09	4,06 ± 1,47	4,84 ± 3,77	23,66 ± 3,75	11,93 ± 1,43
Ma10	4,47 ± 0,35	2,16 ± 0,60	11,17 ± 1,01	7,69 ± 1,96
Mo09	4,93 ± 1,44	3,38 ± 0,28	19,50 ± 6,13	9,70 ± 3,35
Mo10	5,48 ± 0,29	12,69 ± 1,32	24,11 ± 3,47	11,07 ± 1,34
O090	5,36 ± 0,96	6,40 ± 2,03	20,71 ± 1,40	20,65 ± 3,95
O101	5,36 ± 0,18	8,17 ± 0,95	17,66 ± 0,70	21,21 ± 6,08
O106	4,47 ± 0,21	4,82 ± 2,57	23,85 ± 9,83	9,66 ± 0,51
O111	5,28 ± 1,36	13,97 ± 8,82	18,70 ± 2,12	6,87 ± 0,7
O117	5,08 ± 1,86	4,33 ± 1,96	17,25 ± 0,62	19,25 ± 1,15
P090	3,35 ± 0,28	6,85 ± 0,20	32,06 ± 9,08	20,32 ± 5,27
P101	5,11 ± 1,39	5,65 ± 0,16	18,26 ± 1,69	11,08 ± 2,74
P106	5,48 ± 1,00	7,50 ± 2,06	17,17 ± 5,62	16,91 ± 4,82
P116	4,29 ± 0,47	2,93 ± 0,10	16,91 ± 0,01	28,38 ± 6,5
P118	7,05 ± 1,06	6,67 ± 2,71	32,08 ± 5,88	17,72 ± 4,62
Pi09	4,42 ± 0,07	9,82 ± 0,25	18,84 ± 0,92	11,20 ± 1,48
Pi10	6,62 ± 1,32	8,14 ± 3,86	20,55 ± 4,53	9,72 ± 0,63

Tabela 4.13: Continuação do perfil dos compostos fenólicos das amostras analisadas em mg por kg de azeite. Os valores representam a média e o desvio padrão de triplicados

Amostra	Hidroxitirosol		Oleuropeína		Ácido Ferúlico		Total	
AL09	14,87	±6,39	45,26	± 19,2	16,32	± 1,80	127,49	± 31,94
Co09	36,80	± 12,71	59,48	± 3,21	11,66	± 2,39	154,64	± 23,17
Co10	19,83	±3,80	67,07	± 3,43	9,86	± 1,34	139,08	± 10,93
Ma09	6,29	± 2,65	8,91	± 2,08	12,33	± 0,86	72,01	± 16,01
Ma10	9,19	± 2,09	49,09	± 9,85	7,27	± 1,07	91,05	± 16,93
Mo09	7,91	± 1,72	29,17	± 8,16	4,85	± 0,83	79,44	± 1,91
Mo10	35,90	± 11,53	15,14	± 7,27	13,19	± 2,58	117,57	± 27,80
O090	6,94	± 1,12	22,42	± 0,75	13,82	± 4,06	96,30	± 14,27
O101	13,21	±2,40	74,28	± 6,51	5,91	± 0,56	145,78	± 17,38
O106	4,93	± 3,84	36,09	± 2,88	16,71	± 2,29	100,54	± 22,13
O111	26,33	± 2,45	49,61	± 3,98	7,03	± 0,48	127,79	± 19,91
O117	8,67	± 8,15	46,07	± 10,51	9,60	± 0,90	110,25	±25,15
P090	4,51	± 2,47	21,77	± 14,04	10,39	± 1,27	99,25	± 32,61
P101	6,99	± 6,37	69,83	± 1,70	10,17	± 3,08	127,09	± 17,13
P106	14,90	± 5,06	78,88	± 19,58	5,51	± 0,89	146,35	± 39,03
P116	14,07	± 3,98	59,18	± 10,68	18,62	± 0,41	144,39	± 22,15
P118	43,12	± 10,79	43,85	± 8,82	7,13	± 1,80	157,62	± 35,68
Pi09	3,06	± 0,46	60,48	± 6,28	8,04	± 2,29	115,86	± 11,75
Pi10	7,21	± 3,06	69,24	± 27,45	8,62	± 0,05	130,09	± 40,90

Nas amostras analisadas pode-se verificar que juntos, oleuropeína e hidroxitirosol, representam em média 50% do total dos compostos fenólicos encontrados nas amostras, porém nenhuma relação linear foi obtida em relação ao poder antioxidante total ou ao período de indução dos azeites analisados.

De entre as amostras monovarietais, a Mançanilha foi a que apresentou o menor teor dos compostos analisados. A amostra Ma09 apresentou o menor teor, sendo 6,29 mg/kg de tirosol e 8,91mg/kg de oleuropeína de um total de 72,01 mg/kg; a amostra Ma10 apresentou também um teor baixo de hidroxitirosol, 6,29 mg/kg mas apresentou um bom resultado de oleuropeína 49,09 mg/kg de um total analisado de 91,05 mg/kg. As amostras da variedade Picual apresentaram valores intermedios, Porém apresentaram os menores teores de hidroxitirosol, 3,06 mg/kg para Pi09 e 7,21 mg/kg para Pi10, sendo os valores de oleuropeína superiores aos demais, 59,48 mg/kg Pi09 e 69,24 mg/kg Pi10 dos totais de 115,86 mg/kg para a

amostra de 2009 e 130,09 mg/kg para 2010. Por consequência, a amostra Cobrançosa apresentou os maiores teores totais, sendo 154,64 mg/kg (2009) e 139,08 mg/kg (2010) e os valores de hidroxitirosol 36,80 mg/kg (2009) e 19,83 mg/kg (2010) e oleuropeína 59,48 mg/kg (2009) e 67,07 mg/kg (2010).

Para as amostras de azeites multivarietais, os maiores teores foram apresentados pelas amostras P106 (146,35 mg/kg), P118 (157,62 mg/kg) do lagar Pecoliva e O101 (145,78 mg/kg) do lagar Olicer.

Os compostos fenólicos presentes em azeites, por serem solúveis em ambas as fases, podem ainda variar quando no momento de extração, na separação óleo-água, uma parte dos compostos fenólicos são separados junto com a água retirada pela centrifugação. Quanto maior o teor em água no óleo, maior será a perda (Benito et al., 2012).

4.7 Tempo de Indução (Rancimat)

O aparelho Rancimat foi o primeiro a utilizar a medição da condutividade elétrica para determinar o tempo de indução de produtos. O programa introduzido no instrumento calcula-o automaticamente e reproduz de forma gráfica e numérica, por meio de uma impressora, o valor já calculado.

Em síntese, o aparelho procede à leitura automática no tempo da condutividade e regista-a na forma gráfica. Duas retas são assim construídas, matematicamente paralelas, correspondentes ao período inicial (estável) e final (de aumento rápido da condutividade). O ponto de interseção destas retas corresponde então ao tempo de indução da amostra. Valores menores indicam estabilidade e valores superiores a oxidação rápida e degradação do produto analisado (figura 4.1). No azeite os principais ácidos voláteis resultantes da composição oxidativa e que aumentam a condutividade elétrica são os ácidos fórmico, acético e capróico (Antoniassi, 2001).

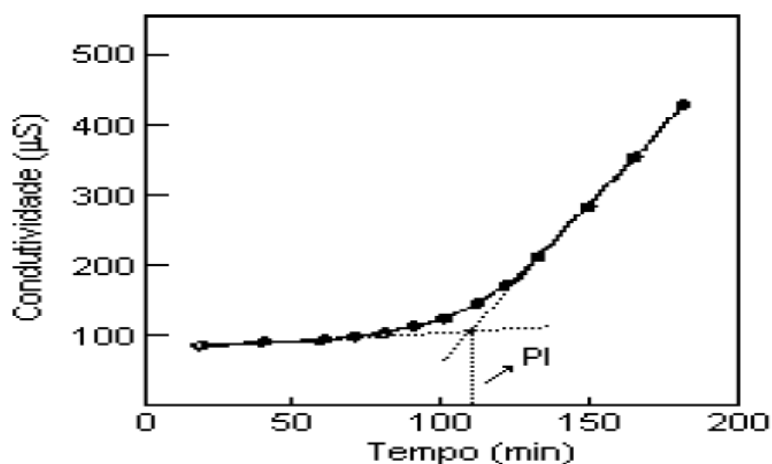


Figura 4.1: Cálculo do tempo de indução (PI período de indução)

Para este trabalho foram realizados os ensaios ás temperaturas de 110, 120, 130 e 140 °C, de modo a obter as equações de reta (que estão representadas nas figuras 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5) e poder calcular o tempo de vida útil dos produtos quando armazenados a 15 e 18 °C.

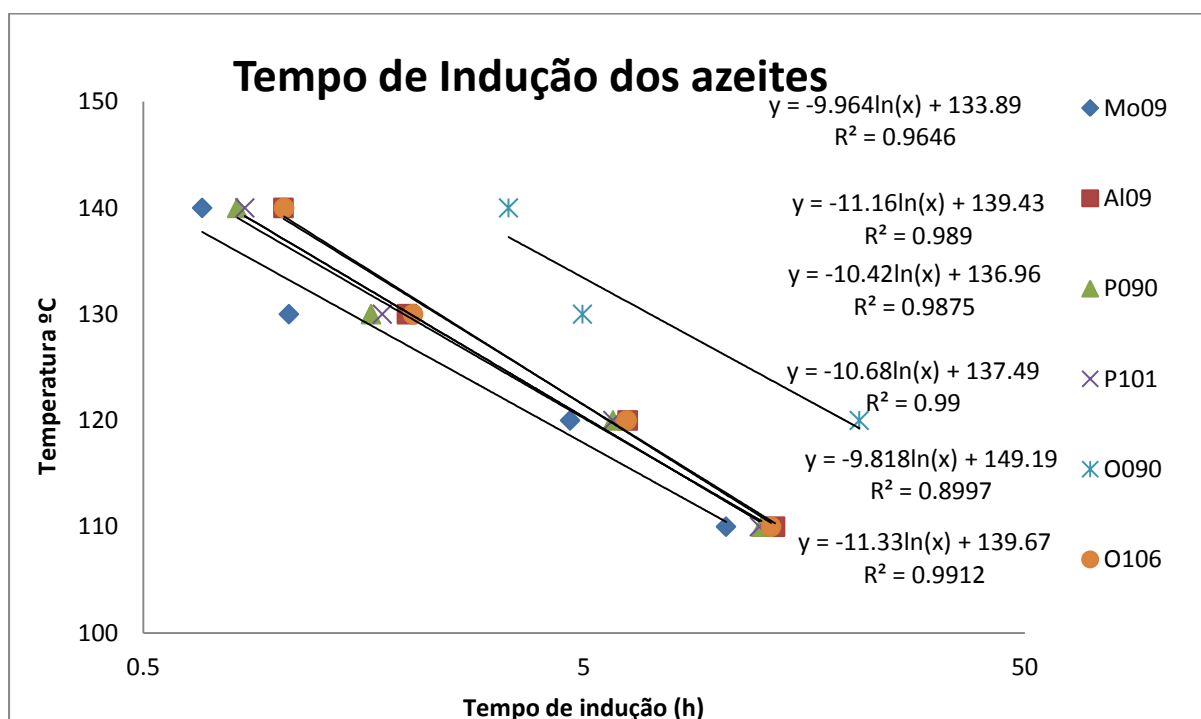


Figura 4.2: Variação do valor do Tempo de Indução com a temperatura para amostras de azeites da colheita de 2009 e 2010

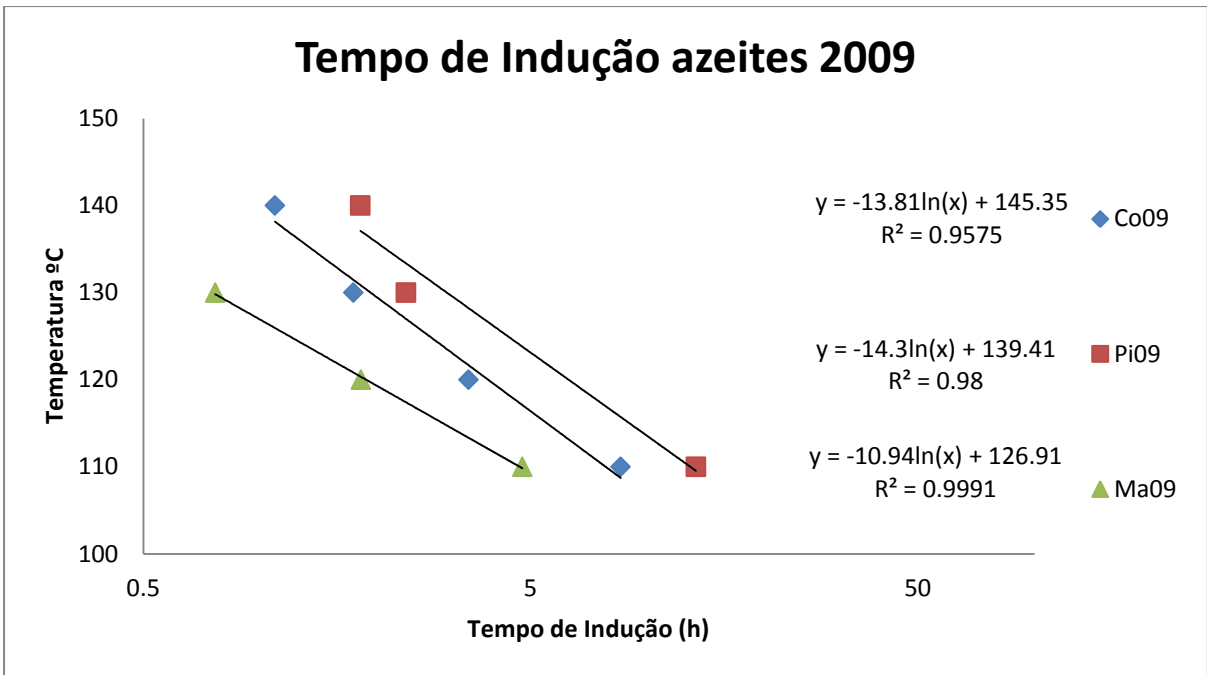


Figura 4.3: Variação do valor do Tempo de Indução com a temperatura para amostras de azeites da colheita de 2009

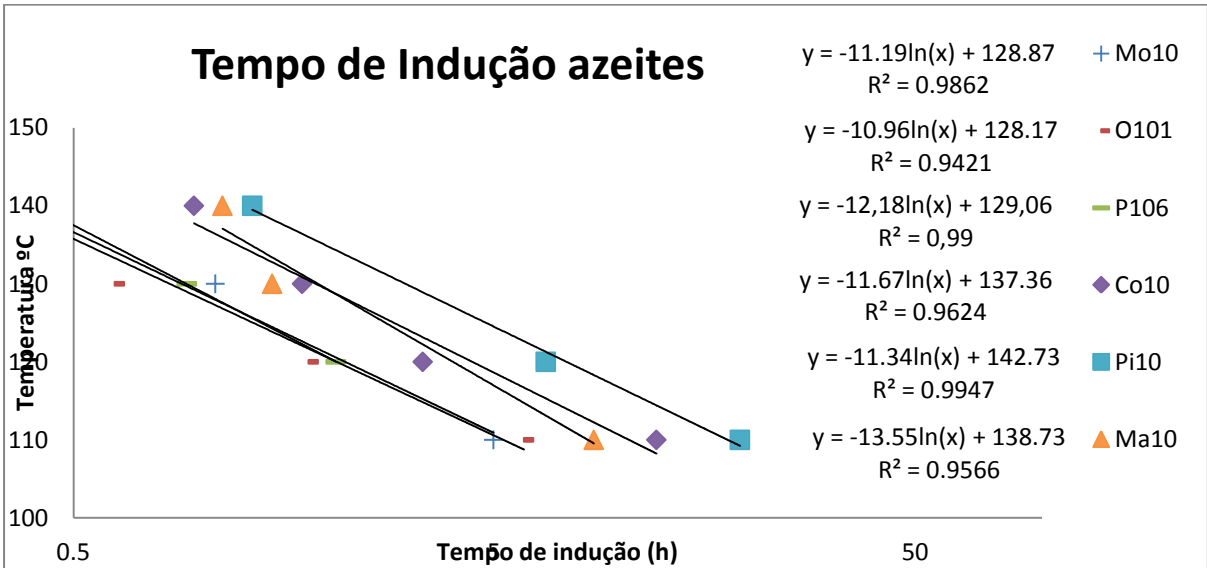


Figura 4.4: Variação do valor do Tempo de Indução com a temperatura para amostras de azeites da colheita de 2010

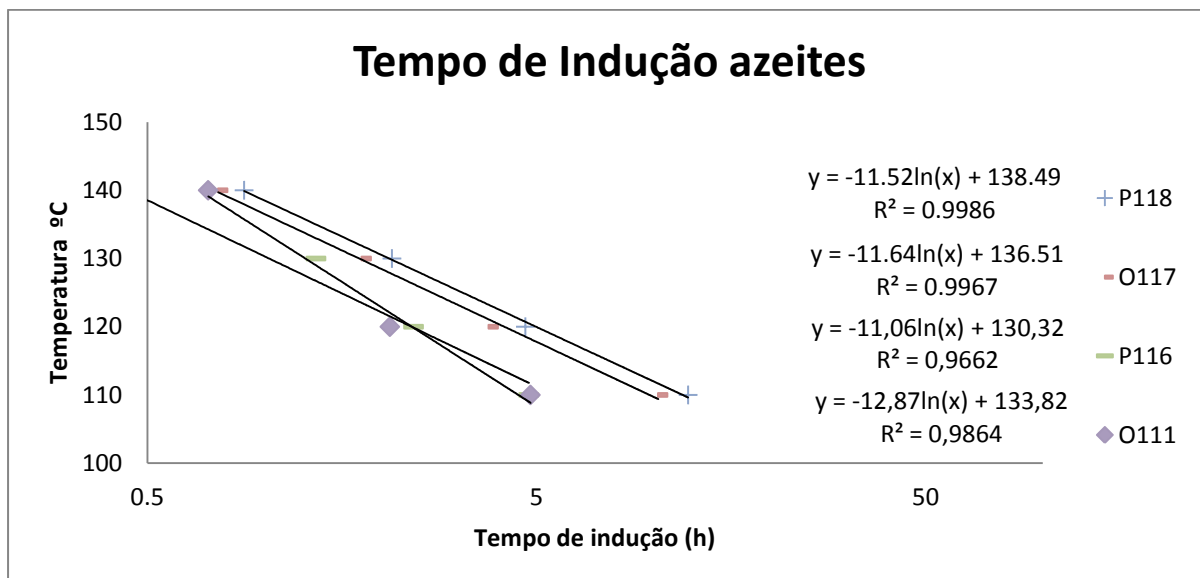


Figura 4.5: Variação do valor do Tempo de Indução com a temperatura para amostras de azeites da colheita 2011

Com os valores de retas obtidos pelos gráficos foi possível estimar o tempo de prateleira (anos) das amostras analisadas. Estes valores encontram-se na tabela 4.14.

De acordo com a tabela 4.14 pode-se observar que entre as amostras analisadas de azeites monovarietais, as amostras da variedade Picual apresentaram o maior tempo de vida útil, sendo 5,4 e 6,6 anos para a temperatura de armazenamento de 15 °C, as amostras de Maçanilha apresentaram valores 2,6 e 1,6 anos e Cobrançosa 1,6 e 4,1 (para as produções de 2009 e 2010 respectivamente).

A amostra Olicer de 2009, apresentou um elevado tempo de armazenamento para ambas as temperaturas. Pode-se verificar também que a mesma amostra contém teores elevados de compostos fenólicos, antioxidantes totais e um valor de IC₅₀ (a apresentar no próximo capítulo) superior às demais amostras analisadas. Os valores apresentados são superiores a 4 vezes o valor das demais amostras. Não existe evidência de erros analíticos, uma vez mais as análises apresentaram valores dissemelhantes.

Tabela 4.14: Tempo de prateleira (*shelf-life*) dos azeites analisados, quando armazenados as temperaturas de 15 °C e 18 °C, expressos em anos

Amostra	15 °C (anos)	18 °C (anos)	R ²
Al09	5,3	4,1	0,989
Co09	1,6	1,3	0,958
Co10	4,1	3,2	0,962
Ma09	2,6	2,0	0,999
Ma10	1,6	1,3	0,876
Mo09	7,9	6,0	0,965
Mo10	3,0	2,3	0,995
O090	98,5	72,5	0,900
O101	3,5	2,6	0,942
O106	6,9	5,3	0,991
O111	1,5	1,2	0,986
O117	3,9	3,0	0,997
P090	6,9	5,2	0,988
P101	5,8	4,5	0,990
P106	1,4	1,1	0,993
P116	1,9	1,5	0,966
P118	5,2	4,0	0,999
Pi09	5,4	4,1	0,980
Pi10	6,6	5,2	0,986

R² : Coeficiente de correlação da reta tempo de indução VS temperatura

As amostras de misturas varietais Almodovar, Monchique e Pecoliva da safra 2009 apresentaram maiores valores de tempo de vida, sendo eles 5.3 , 7.9 e 6.9 anos respectivamente, o que chama a atenção para o facto de que as amostras da safra de 2010 apresentaram valores inferiores. Estes valores podem estar relacionados com um maior stress que as plantas tenham enfrentado no ano de 2009, factor este que obriga as plantas a produzirem maior concentrações de compostos de proteção da própria planta, tais como fenóis, ácido ascórbico, tocoferóis, clorofilas e carotenóides, facto este que pode ser evidenciado na comparação destes compostos em tabelas anteriores (Tura et al., 2007).

De recordar que estes valores foram calculados através de uma regressão de valores logarítmicos representados nos gráficos analisados. Isso significa que uma

pequena variação no declive da reta poderia causar uma variação muito grande no resultado final, pois a resposta teria uma variação exponencial. Todos as retas apresentaram valores elevados de correlação, ou seja, R^2 .

Analise Estatística

Como característica fundamental, a longevidade do produto (o tempo de prateleira), foi uma das variáveis escolhidas para ser analisada. De modo a determinar, de entre dos componentes analisados, quais os factores de maior importância e que podem ajudar a melhor prever o tempo de indução das amostras.

Neste sentido, a análise estatística ANOVA, foi aplicada aos resultados obtidos e as tabelas a seguir são um resumo do estudo realizado.

De acordo com a análise estatística (tabela 4.15) pode-se verificar que esta variável não apresenta linearidade significativa com as demais variáveis analisadas quando comparadas como um todo, não se podendo assim construir um modelo para prever o tempo de indução do azeite a partir de várias componentes. Porém, de acordo com análises posteriores de significância e sua validade, o factor Índice de Peróxidos apresenta um efeito negativo sobre o tempo de indução, enquanto as variáveis IC_{50} e concentração de antioxidantes totais apresentam efeito positivo. Estes resultados comprovam que o teor de compostos antioxidantes no azeite favorece positivamente a resistência à oxidação, aumentando assim o tempo de prateleira do produto.

Tabela 4.15: ANOVA para a variável dependente tempo de indução a 110°C

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t		Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error	
1	(Constant)	6,116	5,138		1,190		,255
	Acidez	,946	1,626	,175	,582		,571
	Peróxidos	-,082	,173	-,160	-,473		,644
	Fenólicos	-,021	,037	-,357	-,581		,571
	IC_{50}	,039	,024	,726	1,612		,131
	TOA	,017	,044	,272	,397		,698

a Variável dependente: Tempo de indução

Porém, quando retiradas algumas das variáveis (tabela 4.16), verifica-se que o IC₅₀, ou seja, a quantidade de antioxidantes equivalentes de ácido ascórbico, é significativo, com um grau de significância de 0,002, quando analisado em separado.

Tabela 4.16: ANOVA para a variável dependente tempo de indução a 110°C (IC₅₀)

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t		Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error	
1	(Constant)	5,380	1,622		3,316		,004
	IC ₅₀	,035	,010	,658	3,601		,002

a Variável dependente : tempo de indução

Se considerarmos uma significância de 95%, pode-se verificar que as variáveis Índice de Peróxidos e antioxidantes totais (tabela 4.17) também podem prever o tempo de indução dos azeites analisados, quando realizada a análise em conjunto desses factores.

Tabela 4.17: ANOVA para a variável dependente tempo de indução a 110°C (TOA e Índice de peróxidos)

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t		Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error	
1	(Constant)	6,751	4,516		1,495		,154
	Peróxidos	-,213	,102	-,417	-2,082		,054
	TOA	,029	,013	,444	2,216		,042

a Variável dependente: tempo de indução

Outro factor também relacionado de forma linear e separado dos demais é o K₂₃₂, que apresenta uma significância de 95%.

Para a variável tempo de indução, o que se observou foi uma correlação com as variáveis independentes IC₅₀ e acidez, com um intervalo de confiança de 95% (tabela 4.18). No tocante a este facto, seria possível uma melhor compreensão do tempo de vida e das propriedades antioxidantes dos azeites analisados, se fossem realizados ensaios do teor de tocoferóis presentes no azeite. Segundo Bobbio e Bobbio (2003) existe uma relação de sinergismo entre o ácido ascórbico e o tocoferol no tocante às propriedades antioxidantes, ou seja, um estudo mais elaborado sobre as variações das composições destes dois compostos poderia elucidar melhor os mecanismos de captação de radicais livres dos azeites da região.

Tabela 4.18: ANOVA para a variável dependente tempo de vida útil

Coefficients(a)						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta	B	Std. Error
1	(Constant)	-31,413	5,211		-6,029	,000
	IC ₅₀	,191	,018	1,124	10,557	,000
	Acidez	7,243	1,829	,421	3,960	,001

a Variável dependente: Tempo de vida útil.

4.8 IC₅₀, método DPPH

O valor de IC₅₀ faz referência à quantidade necessária de um composto para diminuir em 50% a capacidade de redução do composto 2,2'-defenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). Com a equação de reta obtida para o padrão (figura 4.6) foi possível calcular o valor do IC₅₀ para a curva padrão de ácido ascórbico, 194,29 mg/L (Figura 4.6), ou seja, a massa de ácido ascórbico necessária para reduzir em 50% a capacidade oxidante do radical DPPH.

Foram construídas retas semelhantes para os resultados obtidos com as amostras (figuras 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11) e assim pode-se calcular o valor de IC₅₀ para os azeites, ou seja, a quantidade (em gramas) de azeite por mL de solvente necessária para inibir 50% do radical DPPH.

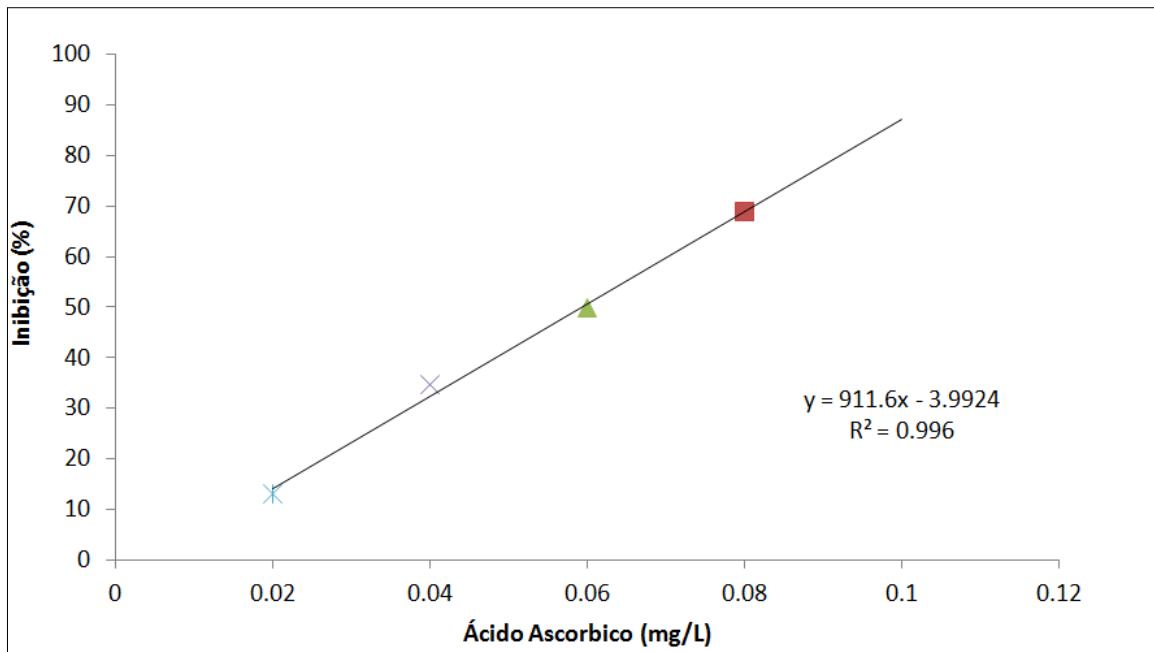


Figura 4.6: Retas de calibração padrão de inibição do radical DPPH usando soluções de ácido ascórbico

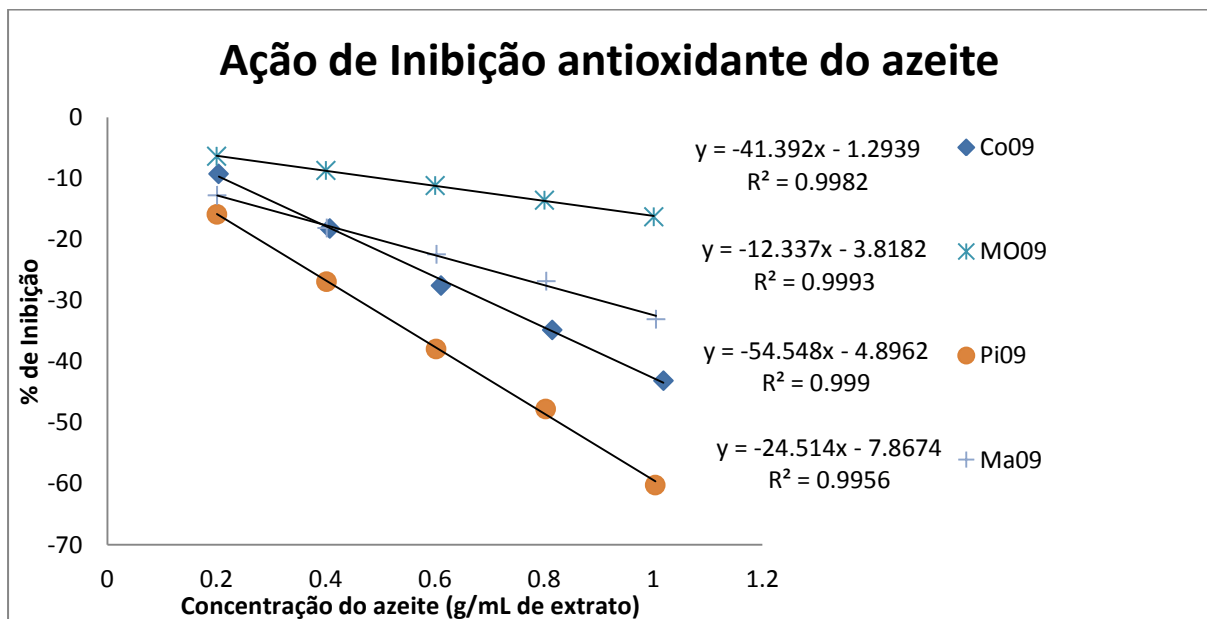


Figura 4.7: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2009)

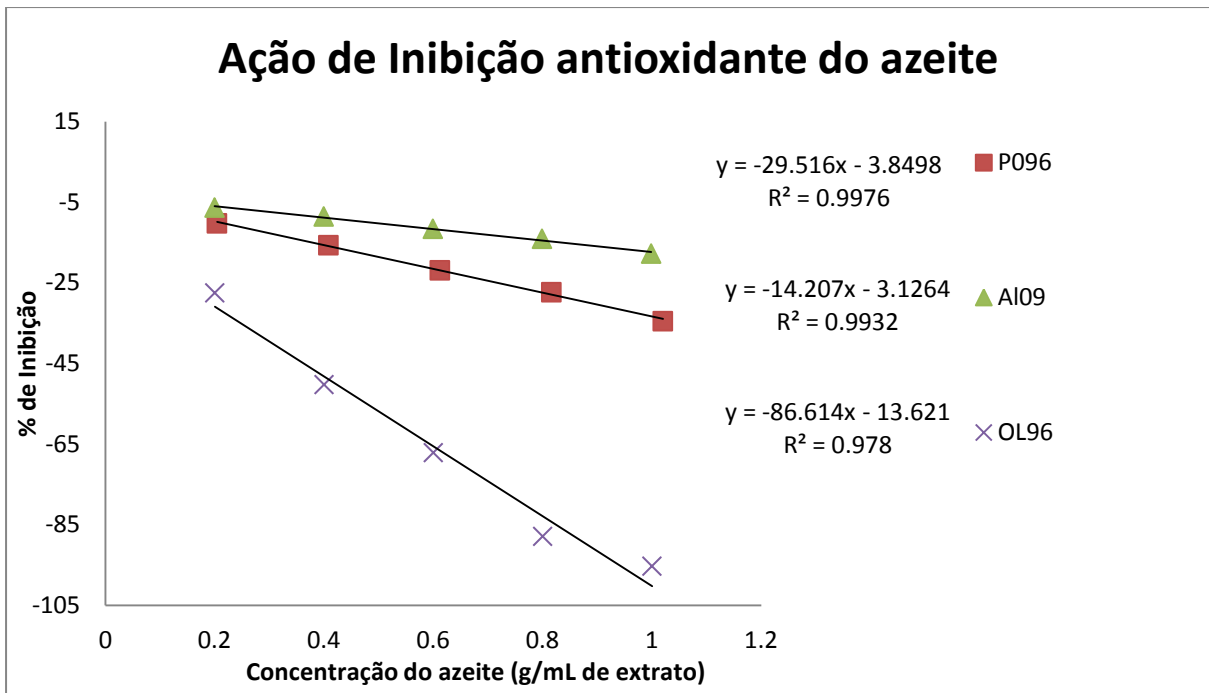


Figura 4.8: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2009 continuação).

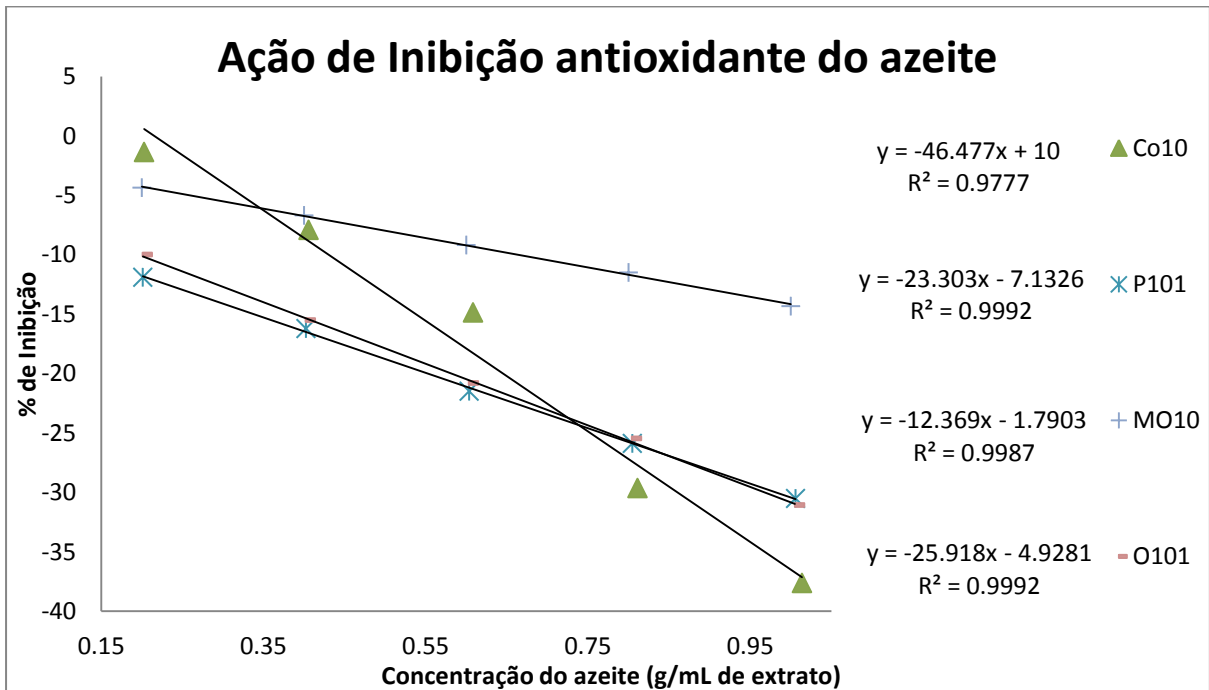


Figura 4.9: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2010)

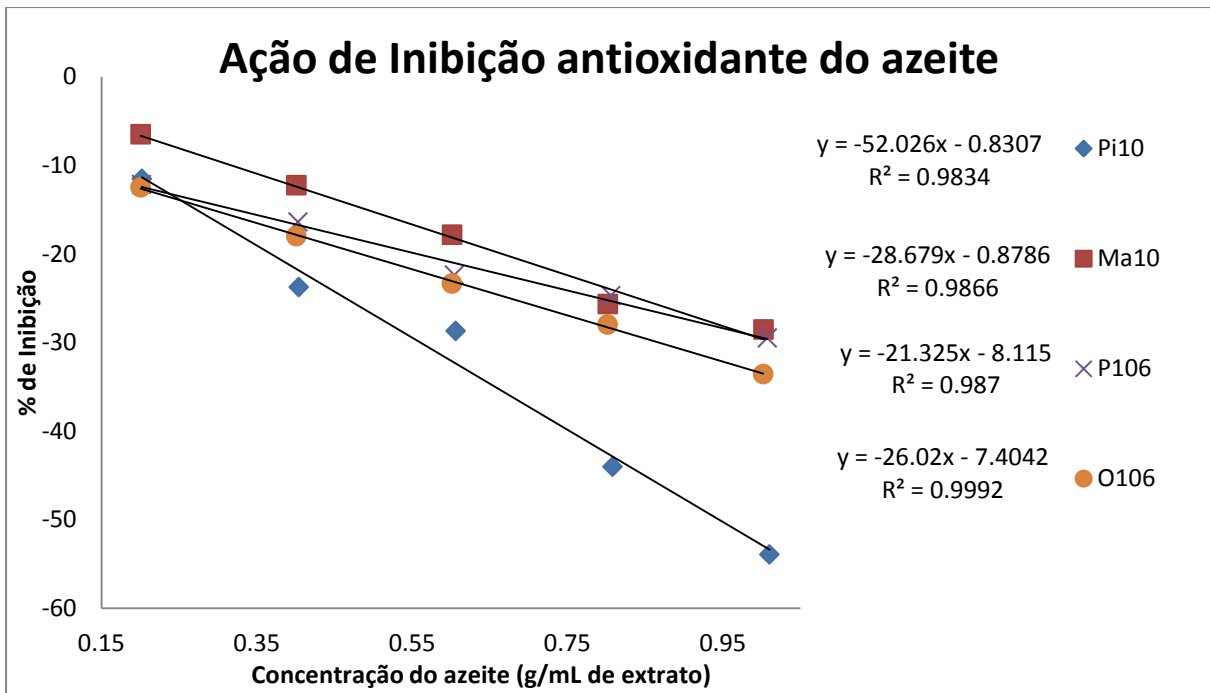


Figura 4.10: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2010 continuação)

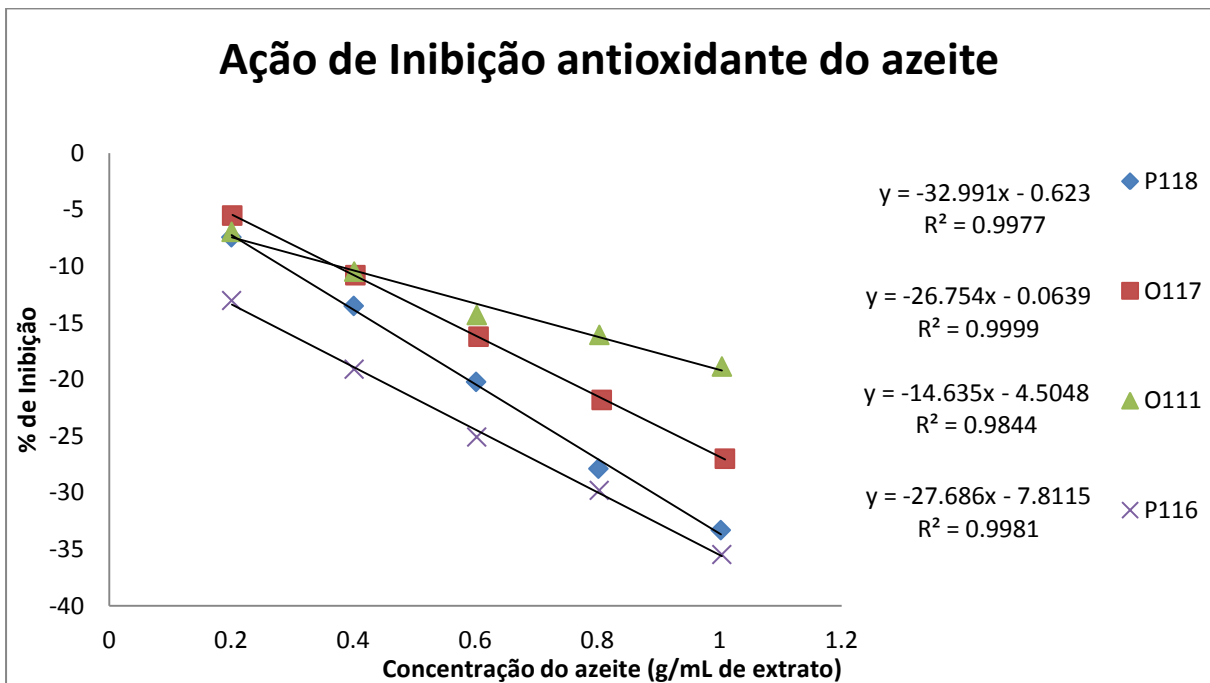


Figura 4.11: Retas de Inibição anti-oxidante das amostras de azeite em diferentes diluições (amostras 2011)

Com as equações de reta obtidas nos gráficos anteriores foi possível calcular a capacidade antioxidante equivalente em ácido ascórbico dos azeites (tabela 4.19).

Tabela 4.19 : Valores de IC₅₀ (em g de amostra por mL de solvente) e de antioxidantes equivalentes (mg por litro de azeite) em ácido ascórbico

Amostra	IC ₅₀ (g/mL)	R ²	Antioxidantes mg/L de azeite
Al09	3,30	0,99	59,80
Co09	1,18	1,00	167,66
Co10	1,29	0,98	152,82
Ma09	1,72	1,00	114,79
Ma10	1,71	0,99	115,19
MO09	3,74	1,00	52,70
Mo10	1,74	1,00	113,59
O101	3,90	1,00	50,62
O106	1,64	1,00	120,52
O111	3,11	0,98	63,46
O117	1,87	1,00	105,70
O090	0,42	0,98	469,72
P090	1,56	1,00	126,18
P101	1,84	1,00	107,25
P106	1,96	0,99	100,45
P116	1,52	1,00	129,47
P118	1,50	1,00	131,82
Pi09	0,83	1,00	238,42
Pi10	0,95	0,98	208,75

R² : Coeficiente de correlação da reta padrão de ácido ascórbico

Os valores de IC₅₀ encontrados para os azeites serviram de base para o cálculo de antioxidantes presentes por litro de azeite equivalentes ao ácido ascórbico, ou seja a quantidade de antioxidantes presentes no azeite necessária para reduzir em 50% a atividade do radical DPPH.

Os valores obtidos estão na faixa de 50,62 mg/kg a 469,72 mg/kg (antioxidantes presentes por kg de azeite), sendo que a amostra Olicer de 2010 (O101) foi a amostra que apresentou a menor concentração, ou seja, dentre as amostras, apresentou o menor poder antioxidante frente ao radical DPPH. Por outro lado, a amostra de 2009 do mesmo lagar, a O090, apresentou o maior valor de antioxidantes equivalentes dentre todas, com 469,72 mg/kg, valor este

aproximadamente 9 vezes superior ao da amostra um ano mais nova proveniente do mesmo lagar.

As amostras monovarietais apresentaram valores médios de poder antioxidante, sendo que a amostra Picual apresentou os maiores valores, 238,42 mg/kg para 2009 e 208,75 mg/kg para 2010, em segundo lugar ficou a Cobrançosa, 167,66 mg/kg para 2009 e 152,82 mg/kg para 2010; Maçanilha apresentou os menores valores entre as três, 114,79 mg/kg para 2009 e 115,19 mg/kg para 2010. Estes valores, associados a outros factores dizem-nos que a monovarietal Picual apresenta maior poder antioxidante do que as demais amostras, levando portanto ao um produto mais saudável e mais resistente ao tempo de armazenamento.

Dentre as amostras destaca-se ainda o facto de que as amostras analisadas referentes ao ano de 2009 se sobrepõem às demais em quantidade de ácido ascórbico equivalente. Este facto vem a confirmar que a safra de 2009 possui melhores características nutricionais quando comparadas ao ano de 2010, o que pode estar relacionado com variações climáticas daquele ano, considerando que os compostos antioxidantes são produzidos nas plantas como mecanismo de defesa a factores externos como forma de protecção da planta.

6. Conclusão

O processo de maturação conduz a diferentes processos metabólicos, com uma conseqüente variação no perfil de compostos do azeite produzido, tais como concentração de triglicerídeos, ácidos gordos, polifenóis, clorofilas e carotenóides, sendo que estas alterações químicas se refletem nas características sensoriais (especialmente no sabor), na estabilidade oxidativa e/ou valor nutricional do produto final e, obviamente na qualidade final (Matos et al., 2007).

Os altos índices de peróxidos e acidez das amostras (multivarietais) são característicos de produtos obtidos de azeitonas de com um grau de maturação mais avançado. Estas amostras não podem portanto ser classificadas como extra-virgem.

As amostras monovarietais (com maior valor comercial) apresentaram valores dentro dos padrões estabelecidos pela Comissão Europeia (EU) N° 61/2011 para classificação como azeites extra virgens.

Com relação ao teor de compostos fenólicos, os óleos vegetais são ricos em compostos capazes de captar oxigênio e evitar a sua oxidação durante o período de armazenamento (Ryan & Robards, 1998), dentre estes podemos citar os compostos fenólicos, clorofilas e carotenóides, sendo que os compostos fenólicos contribuem ainda para o sabor dos azeites (Benito et al., 2012). Os resultados obtidos para os azeites analisados apresentaram teores de compostos fenólicos entre 190,85 mg/Kg e 516,75 mg/kg, valores estes de acordo com a média encontrada na literatura.

O resultados obtidos para o estudo da cor, mostraram boa correlação entre a componente b^* com o teor de carotenóides e da componente a^* com o teor de clorofilas, correlação esta já citada por Moyano et al., (2008) em seu trabalho. Segundo Matos et al., (2007) o teor de pigmentos de cor decresce com o índice de maturação dos frutos. Os valores iniciais da concentração de clorofilas apresentados por ele são em média entre 25 mg/Kg a 30 mg/Kg iniciais até 2 mg/Kg a 5mg/kg em estágios mais avançados, o que nos permite concluir que as baixas concentrações de compostos de pigmentos (clorofilas e carotenóides) encontrados nas amostras indicam um estado de maturação avançado.

7. Propostas de trabalhos futuros

Uma análise sensorial para avaliar as relações entre o teor de compostos fenólicos e os descritores sensoriais é uma proposta para trabalhos futuros.

Trabalhos complementares de avaliação das condições climáticas e da composição do solo e sua influencia sobre o teor de compostos fenólicos pode ser de grande ajuda para elucidar o mecanismo destas variáveis sobre a qualidade do azeite regional.

Uma proposta interessante seria a apresentação de resultados aos lagares da região e de certa forma trabalhar na orientação para que, na medida do possível, as condições de extração sejam uniformizadas, bem como avaliar a possibilidade de planejar e registar as misturas realizadas, podendo desta forma traçar um perfil mais fiel à realidade desses azeites de mistura. O trabalho em conjunto poderia ainda, ser uma via para a instituição de um trabalho cooperativo que pode favorecer a qualidade bem como elevar o valor comercial do produto Algarvio.

8. Bibliografia

- Aguilera, M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: Frantoio and Leccino, grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89(3), 387–391. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.046
- Antoniassi, R. (2001). Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. *B. CEOOA*, 19(2), 353–380.
- AOCS. (n.d.). Official Method. American Oil Chemist Society.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1679–719.
- Benito, M., Lasa, J. M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., & Sánchez-Gimeno, A. C. (2012). Evolution of phenols and pigments in extra virgin olive oil from irrigated super-intensive orchard. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(5), 558–567.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; (2002). Section 19.2, Light Absorption by Chlorophyll Induces Electron Transfer.
- Boskou, D. (2007). *Olive oil Chemistry and Technology*. (D Boskou, Ed.) *World review of nutrition and dietetics* (Second Edi., Vol. 97, p. 255). Thessaloniki, Greece.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science an Technology*, 28, 25–30.
- Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. (2003), Introdução à Química de Alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela.

- Carrasco-Pancorbo, a, Cerretani, L., Bendini, a, Segura-Carretero, a, Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., ... Fernández-Gutiérrez, a. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(23), 8918–25.
- CE 1989. (2003). Commission of the European Communities CE 1989/2003. *Official Journal of the European Union*, (1989).
- CE 510/2006. (2006). Regulamento (CE) No 510/2006. *Jornal Oficial da uniao Europeia*, 12–25.
- Cioffi, G., Pesca, M., Caprariis, P. De, Braca, A., Severino, L., & Tommasi, N. De. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, (121), 105–111.
- Crnko, S. (2012). *Quality parameters and oxidative stability of virgin olive oils of the Oblica variety*. University of Zagreb.
- Curinha, J. V. C. M. (2008). *Adição de produtos químicos e ensaios de electro-coagulação e electro-oxidação para o (pre) tratamento das aguas residuais provenientes dos lagares de produção de azeite*. Universidade Nova de Lisboa.
- Custódio, T. (2009). *Azeites virgem extra comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade*. Universidade do Porto.
- Dos Santos, P. G. M. M. (2011). *Análise do mercado de exportação de azeite Português*. Universidade Técnica de Lisboa.
- Duarte-Almeida, J. M., José, R., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno / Ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 446–452.
- Europeia, C. (2011). Regulamento (UE) No 61/2011. *Jornal Oficial da união Europeia*, (2), 1–14.

- Fontana, J. D., Mendes, S. V., Persike, D. S., Peracetta, L. F., & Passos, M. (2000). Carotenoides Cores Atraentes e Ação Biológica. *Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento*, 13, 40–45.
- Frickel, F. (1984). Chemistry and Physical Properties of Retinoids. In M. B. Sporn, A. B. Roberts, & D. S. Goodman (Eds.), *The Retinoids* (Volume 1., pp. 8–128). Ludwigshafen, Germany: Academic Press.
- Ganesan, P., Chandini, S. K., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8), 2717–2723.
- Garcia, V. S. G. (2010). *Efeito de flavonóides na captação de HOCl produzido por neutrófilos activados e modulação do factor de transcrição NF - kB em células THP - 1 - análise da relação estrutura - actividade* -. Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências.
- García-González, D. L., & Aparicio, R. (2010). Research in olive oil: challenges for the near future. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(24), 12569–77.
- Gaspar, P., & Pinto, E. J. (2012). Guide to nature tourism in the algarve. Algarve: Algarve Tourism Board.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., Pera, L. La, & Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101(2), 833–837.
- Grigoriadou D, Tsimidou M Quality control and storage studies of virgin olive oil: exploiting UV spectrophotometry potential *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2006), 108, 61–69.
- Ganesan, P., Chandini, S. K., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8), 2717–2723.
- Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(11), 966–968.

- Harwood, J., & Aparicio, R. (2000). *Handbook of olive oil: Analysis and properties* (pp. 186–187).
- Hayes, J., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M., & Kerry, J. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol. *Food Chemistry*, (126), 948–955.
- Huang, Y., Chang, Y., Shao, Y. (2005) Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in taiwan. *Food Chemistry* 98, 529-538.
- Instituto Nacional de estatística, I. P. (2009). *Recenseamento Agrícola 2009 - Analise dos principais resultados*. (I. P. Instituto nacional de Estatísticas, Ed.) (Ed. 2011., p. 62). Estatísticas Oficiais.
- IOC. (2007). *Production techniques in olive growing*. (A. Tombesi, S. Tombesi, M. M. S. Saavedra, R. F. Escobar, R. D'Andria, A. Lavini, & T. Jardak, Eds.) (First edit., p. 347). Madrid, Spain: Olive Oil Council.
- Isabel, M. M., Gandul-rojas, B., Sanchez-, A. H., & Garrido-fernandez, J. (1991). Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil, *68*(5), 332–336.
- Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chemistry*, (124), 242–247.
- Luna, G., & Aparicio, R. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 614–627. doi:10.1016/j.
- Luo, H., Wang, B., Yu, C., Qu, Y., & Su, C. (2010). Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(18), 2557–2565.

- Matos, L., Pereira, J., Andrade, P., Seabra, R., & Oliveira, M. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry*, 102(3), 976–983.
- Minguez-mosquera, M. I., Gandul-rojas, B., & Garrido-fernandez, J. (1990). Pigments Present in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 37(3), 192–196.
- Moyano, M. J., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2010). The Color of Olive Oils: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 278–291.
- Moyano, M. J., Meléndez-Martínez, A. J., Alba, J., & F.J., H. (2008). A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (II): CIELUV and CIELAB uniform colour. *Food Research*, (41), 513–521.
- Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratocos, M., Katzogiannos, E. (2004) Analysis of minor components in olive oil. *J Biochem. Biophys. Methods*, 61, 155-160.
- Ninfali, P., Bacchiocca, M., Biagiotti, E., Esposto, S., Servili, M., Rosati, A., & Montedoro, G. (2007). A 3-year Study on Quality, Nutritional and Organoleptic Evaluation of Organic and Conventional Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(2), 151–158.
- Nissiotis, M., & Tasioulamargari, M. (2002). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*, 77(3),
- Penz, L. R. (2010). *Estudo das alteracoes fisico-quimicas do azeite de oliva apos tratamento termico*. Centro Universitario Univates.
- Pesquisas, I. N. de. (2009). *Recenseamento Agrícola 2009 - Analise dos principais resultados*. (I. P. Instituto nacional de Estatisticas, Ed.) (Ed. 2011., p. 62). Estatisticas Oficiais.

- Pimentel, I. C.; Magnoni, C. D.; Costa, R. P. Utilização do azeite de oliva na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares. Departamentos da SOCESP, v.17, n.1, 2007.
- Pinheiro, M., & Mello, L. (2012). Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensao*, 537–548.
- Programa Regional de Ordenamento do Território (PROT). Faro: CCDR Algarve, 2006.
- Ramalho, V., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755–760.
- Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., & Lucera, L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 57–67.
- Ryan, D., & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *The Analyst*, 123(5),
- Sousa, C. M. D. M., Rocha, H., Vieira-jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, L. S., Araújo, D. S., ... Moore, M. H. E. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), 351–355.
- Sucupira, N., da Silva, A. B., Pereira, G., & da Costa, J. N. (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *Unopar Ciência, Biologia e Saúde*, 14(4), 263–270.
- Tanouti, K., Elamrani, A., Serghini-Caid, H., Khalid, A., Bahetta, Y., Benali, A., ... Khlar, M. (2010). Characterisation d ' huiles d ' Olive produites dans des cooperatives pilotes (Lakrarma et kenine) au niveau du Maroc oriental. *Les technologies de laboratoire*, 5(18), 18–26.
- Tanouti, K., Elamrani, A., & Tahani, N. (2011). Quality of olive oils produced in east of Morocco. *Eletronic Journal of Environmental, Agriculturel an Food Chemistry*, 10(7), 2439–2450.

- Tasioula-Margari, M. (2001). Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*, 74(3), 377–383.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*, 18(1), 98–112.
- Tsimidou, M. Z. (2006). Olive Oil Quality, (1996), 93–111.
- Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(11), 636–644.
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedò, S., Failla, O., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea L.*) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, 112(1), 108–119.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. a., Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea L.*): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89(4), 561–568.
- Wiseman, S. a, Mathot, J. N., de Fouw, N. J., & Tijburg, L. B. (1996). Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*, 120(1-2), 15–23.

Web sites:

<http://cienciasdosalimentos.wordpress.com/2013/11/26/pigmentos-clorofila/> último acesso 15/06/2014

Blog UAlg, <http://namb-ualg.blogspot.co.uk> acessado em 17/09/2013

Sovena Group, 2012 <http://www.sovenagroup.com/en> ultimo acesso 15/06/2014.